



Exposición a plomo durante el desarrollo y respuestas a etanol en el organismo modelo *C. elegans*

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas

Bioquímica Paula Alejandra Albrecht

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Farmacología

IFEC- CONICET

- 2021-

Directora de Tesis

Dra. Miriam Virgolini

Comisión de Tesis

Dra. Paula Abate

Dr. Ramón Asís

Dra. Liliana Cancela

Evaluador Externo

Dr. Diego Rayes

"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas.

La curiosidad tiene su propia razón de ser"

Albert Einstein

*A mis padres,
Por dejarme volar sin ataduras.*

*A mi familia,
Por acompañarme siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A mi Comisión Asesora de Tesis, quienes fueron muy importantes en este proceso. Paula gracias por tan buena predisposición y optimismo, Lili por tus observaciones siempre certeras y tu escucha permanente, no sólo académicas sino personales. Ramón, por abrirme las puertas de tu laboratorio con humildad y entrega. El giro de mi tesis fue posible en gran parte gracias a vos. Eternamente agradecida.

A mi Evaluador Externo, Diego Rayes, una eminencia, por tomarse el tiempo de evaluar este trabajo.

A mi Directora de Tesis, Miri. Gracias por apoyarme siempre, por tu ayuda en las rectas finales, por buscarle la vuelta conmigo e insuflarme confianza cuando yo flaqueé. Hemos compartidos momentos hermosos y otros muy difíciles. Cada uno de ellos nos hizo crecer a las dos. Gracias por estar a mi lado, no sólo como directora sino como mentora.

A Miki Aschner, que me recibió en su laboratorio de Nueva York con tanta calidez que es difícil de asimilar. Creo que no existen personas tan amables y solidarias como él. Gracias a Miki, a mis *labmates* Airton, Mahfuzur, Bea y Patricia y a la Fundación Fulbright, pude vivir una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida.

A Lucía, mi hermanita científica menor. Más que colega, mi amiga. Gracias por estar al pie del cañón siempre que lo necesité. Por entendernos como sólo nosotras lo hacemos, por respetar mis TOCs y enseñarme tanto, de los gusanos y de la vida. Fue divino compartir mis últimos años de tesis remándola y trabajando juntas a la par.

A mis celeganeras, Lu (ya mencionada), Andre y Yani. No hagan caso a lo que dice esta tesis, lo mejor de este modelo son ustedes, definitivamente. Siempre bancándonos los trapos entre nosotras, que decirles que no sepan. Yani, fuiste mi hada madrina en este último tramo. No tengo palabras para agradecerte. Sos de oro.

A Mara, mi hermana científica mayor, por la buena onda constante y enseñarme los primeros pasos del modelo de ratas. A Romi, que recorrimos este camino desde nuestros inicios. Lavando cajas, poniendo consumos, raleando ratas, hasta haciendo inmunes. Solamente nosotras sabemos todo lo que compartimos estos años y te agradezco por eso. Lo logramos, amiga.

A mis compañeros y compañeras del Dpto de Fármaco, por todos los almuerzos y los mates (pre pandemia), los seminarios compartidos, la buena onda permanente, los debates y los consejos.

A los técnicos y técnicas del Dpto, Lore, Nico, Javi, Yani, Leo y Estela. Todos de una manera u otra han aportado a este trabajo gracias a su buena predisposición y entrega.

A mis papás, a quienes dedico esta tesis. Los sponsors oficiales de todas mis locuras. Quienes festejan mis logros, secan mis lágrimas, me sostienen todo el tiempo y me alientan a seguir. Me siento bendecida de tenerlos. No me alcanzan las hojas de esta tesis para expresarles mi agradecimiento y mi felicidad de compartir este logro con ustedes.

A mis hermanos, Javi, Dolfi y Vero. Por estar siempre presentes. Por bancarme los días buenos y los días malos. Mención especial a Javi; hoy en día en nuestro laboratorio podemos trabajar en esterilidad gracias al ingenio tuyo y de papá. Por esa campana bendita que armaron y el esfuerzo por ubicarla. Sin peros y con determinación. Simplemente gracias.

A mis amigas de siempre, Euge, Ani y Mery. Mis amigas para todo efecto. Desde psicólogas *ad honorem*, hasta compañeras de caminatas, mates, charlas y supervivencia pandémica. Aguante el Belgrano, loco. Saben de sobra lo mucho que significan para mí.

A mis amigos y amigas de Scout. Los Rondas y las Bugus. Por bancarse tantos años de escucharme hablar de la tesis. Sí, algún día iba a terminar. Gracias por estar.

A las organizaciones que financiaron este trabajo: CONICET, SECyT, MINCyT y FONCyT. A Fulbright y AUGM por brindarme la oportunidad de conocer laboratorios extranjeros. Al IFEC / Dpto. de Farmacología por propiciar el espacio para realizar esta tesis.

Y, por último, pero no menos importante, a mi querida Universidad Nacional de Córdoba, donde tuve la posibilidad no sólo de conseguir un título de grado, sino también uno de posgrado. Sólo cuando se conocen otras realidades uno se percata del enorme privilegio que tenemos de tener una universidad pública, laica y gratuita. Y con excelencia académica. Gracias UNC y gracias a mi país por esta oportunidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
PLOMO.....	2
<i>Plomo como contaminante ambiental</i>	<i>2</i>
<i>Toxicocinética</i>	<i>5</i>
<i>Toxicidad.....</i>	<i>7</i>
Sobre diversos órganos y sistemas	7
En el sistema nervioso.....	8
<i>Plomo y adicción a drogas.....</i>	<i>11</i>
ETANOL.....	12
<i>Toxicocinética</i>	<i>13</i>
<i>Efectos del etanol</i>	<i>15</i>
<i>Etanol como droga de abuso</i>	<i>18</i>
Trastornos de uso compulsivo de etanol: concepto de adicción, reforzamiento y factores de riesgo asociados.....	18
Teorías sobre los mecanismos neurobiológicos que median los efectos del etanol	20
PLOMO Y ETANOL	22
EL NEMATODO <i>C. ELEGANS</i> COMO ORGANISMO MODELO.....	23
<i>Historia</i>	<i>23</i>
<i>Características anatómicas y fisiológicas</i>	<i>25</i>
<i>Ciclo de vida.....</i>	<i>27</i>
<i>Ventajas como modelo biológico para evaluar toxicidad</i>	<i>28</i>
<i>Respuestas a drogas de abuso en C. elegans</i>	<i>31</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35

MATERIALES Y MÉTODOS	36
SUJETOS.....	37
<i>Mantenimiento</i>	37
Preparación de los medios de cultivo	38
Crecimiento de bacteria, inoculación y condiciones de ensayo	39
Sincronización	40
Transferencia de gusanos.....	41
Conservación de gusanos a largo plazo	41
MODELO EXPERIMENTAL.....	43
<i>Introducción</i>	43
<i>Ensayos preliminares</i>	45
Protocolo de exposición a acetato de Pb en medio sólido	45
Protocolo de exposición a nitrato de Pb en medio sólido	46
Protocolo de exposición a nitrato de Pb adicionado al pasto de bacteria <i>E. coli</i> OP50.....	47
Protocolo de exposición a nitrato de Pb en medio líquido.....	48
<i>Protocolo de exposición a Pb definitivo</i>	49
PARTE EXPERIMENTAL.....	52
CAPÍTULO 1: MORFOLOGÍA NEURONAL	53
CURVA CONCENTRACIÓN - RESPUESTA DE LOS EFECTOS TÓXICOS DE Pb SOBRE NEURONAS DAÉRGICAS	
<i>Introducción</i>	54
<i>Materiales</i>	55
<i>Procedimiento</i>	56
<i>Resultados</i>	57
<i>Discusión</i>	59
CAPÍTULO 2: RESPUESTA DE ENLENTECIMIENTO BASAL.....	62
RESPUESTA DE ENLENTECIMIENTO BASAL EN CEPAS SALVAJES Y MUTANTES FRENTE A LA EXPOSICIÓN A ETOH.....	63
<i>Introducción</i>	63
<i>Materiales</i>	70
<i>Procedimiento</i>	70
<i>Análisis estadístico</i>	71
<i>Resultados</i>	72

Cepa salvaje (N2).....	72
Cepa que carece de la enzima tirosina hidroxilasa (MT15620)	74
Cepa que sobreexpresa tirosina hidroxilasa (UA57)	76
Cepa que carece del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) (CB1111) ..	78
Cepa que carece de los receptores DOP-1, DOP-2 y DOP-3 (LX734)	80
Cepa que carece de los receptores DOP-4 (RB1254)	82
Cepa que carece del transportador DAT-1 (MAB398)	84
<i>Discusión</i>	86
CAPÍTULO 3: TOLERANCIA FUNCIONAL AGUDA Y QUIMIOTAXIS	95
ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE <i>C. ELEGANS</i> EN RESPUESTA A ETANOL, ACETALDEHÍDO O A LA	
COMBINACIÓN ETANOL/ACETALDEHÍDO	96
<i>Introducción</i>	96
<i>Materiales</i>	102
<i>Procedimiento</i>	102
<i>Análisis estadístico</i>	104
<i>Determinación de alcohol en el agar</i>	104
<i>Resultados</i>	106
Respuesta de gusanos de la cepa N2 frente a distintas concentraciones de EtOH	106
Respuesta de gusanos de la cepa RB2114 frente a 200 mM de etanol	111
Respuesta de gusanos de la cepa N2 frente a 200 mM de etanol y/o 1mM de ACD ..	113
Respuesta de gusanos de la cepa RB2114 frente a 200 mM de etanol y 1mM de ACD	
RESPUESTA A LA EXPOSICIÓN A ALCOHOL ALÍLICO	117
<i>Introducción</i>	117
<i>Materiales</i>	117
<i>Procedimiento</i>	118
<i>Resultados</i>	119
DISCUSIÓN	121
ENSAYO DE QUIMIOTAXIA.....	128
<i>Introducción</i>	128
<i>Materiales</i>	132
<i>Procedimiento</i>	133
<i>Análisis estadístico</i>	134
<i>Resultados</i>	134

Respuesta a concentraciones crecientes de EtOH en cepas N2 (salvaje).....	134
Ensayo de quimiotaxia en N2 frente a SAL	135
<i>Discusión</i>	137
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES	140
TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS	146
BIBLIOGRAFÍA	148

ABREVIATURAS

Δ: delta; tasa de cambio

δ-ALA: ácido delta-aminolevulínico

δ-ALA-D: ácido delta-aminolevulínico dehidratasa

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

AC: adenilciclase

Ach: acetilcolina

ACD: acetaldehído

ADH: enzima alcohol deshidrogenasa

ALDH: enzima aldehído deshidrogenasa

ALDH2: enzima aldehído deshidrogenasa isoforma 2

AMPc: monofosfato de adenosina cíclica

ARNi: ARN de interferencia

As: arsénico

ATV: área tegmental ventral

AUD: *alcohol use disorders*

BHE: barrera hematoencefálica

BSR: *Basal Slowing Response*

C: control

Ca: catión calcio

CAT: catalasa

CC: contorsiones corporales

Cd: catión cadmio

US CDC: *Centers for Diseases Control and Prevention of United States*

CGC: *Caenorhabditis Genetics Center*

COMT: catecol-o-metil transferasa

Cr: cromo

Cu: cobre

CV: cordón ventral

CNV: cordón nervioso ventral

CND: cordón nervioso dorsal

D1R: receptores tipo D1

D2R: receptores tipo D2

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina

DMSO: dimetilsulfóxido

DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DL: dosis letal

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DOPAL: 3,4-dihidroxifenilacetaldehído

E. coli: *Escherichia coli*

EO: estrés oxidativo

EROs: especies reactivas del oxígeno

EtOH: etanol

Fe: catión ferroso

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GFP: *green fluorescence protein*

Glu: glutamato

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GRCR: receptor acoplado a proteína G

GSH: péptido glutatión

H⁺: protón hidrógeno

Hem: hemoglobina

Hg: mercurio

HVA: ácido homovanílico

ICD: *International Classification of Disease*

IP: índice de preferencia

K: potasio

Km: concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción

LB: medio *Luria - Bertani*

LC50: concentración letal 50

LD50: dosis letal 50

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina

LOAEL: *lowest observed adverse effect level*

MAO: enzima monoamino oxidasa

MOR: receptor μ -opioide

NAc: núcleo accumbens

NAC: N-acetilcisteína

NaCl: cloruro de sodio

NaClO: hipoclorito de sodio

NADH: cofactor de nicotin adenin dinucleótido

NGM: agar *Nematode Growth Medium*

Ni: níquel

Pb: plomo

Pb(NO₃)₂: nitrato de plomo

Pb(C₂H₃O₂)₂: acetato de plomo

SAL: salsolinol

Se: selenio

SNC: sistema nervioso central

TDAH: trastorno del déficit de atención

TFA: tolerancia funcional aguda

TRPV: Receptor de potencial transitorio V

TH: enzima tirosina hidroxilasa

VMAT2: transportador vesicular de monoaminas de tipo 2

Zn: zinc

RESUMEN

El plomo es un metal no esencial persistente en el ambiente. Existe amplia evidencia de la toxicidad y efectos adversos que produce en el organismo, particularmente en el sistema nervioso central en desarrollo. Reportes en animales de experimentación relacionan la exposición a este metal con respuestas diferenciales ante determinadas noxas o situaciones aversivas en etapas posteriores de la vida. Entre ellas, una respuesta alterada a drogas de abuso en general, y a etanol en particular. El etanol (alcohol) es una droga de abuso que produce efectos estimulantes motores a bajas dosis por su acción sobre el sistema dopaminérgico y sedativos a dosis mayores, por su acción sobre los sistemas GABAérgico y glutamatérgico.

En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto que ejerce la exposición a niveles bajos de plomo en etapas tempranas del desarrollo en *Caenorhabditis elegans* sobre el sistema dopaminérgico y cómo podría evidenciarse en una respuesta diferencial frente a los efectos del etanol. *C. elegans* es un organismo modelo de amplio uso para el estudio de mecanismos de toxicidad. Es un nematodo de vida libre que posee un genoma completamente secuenciado y una rápida tasa de generación de progenie y crecimiento.

Los estudios se enfocaron en evaluar el impacto de este metal sobre la metabolización de etanol a su primer metabolito, acetaldehído, abordando el análisis de los efectos motivacionales, mediante la prueba de quimioatracción, y estimulantes, a partir de la determinación de la tolerancia funcional aguda al efecto sedativo que produce la exposición a etanol en estos gusanos. Se evaluó además la morfología de las neuronas dopaminérgicas en respuesta a la exposición a plomo, y una conducta denominada Respuesta de Enlentecimiento Basal por la presencia de alimento, que es modulada por la funcionalidad dopaminérgica.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de plomo en etapas tempranas del desarrollo de *C. elegans* provocó una leve alteración en la **morfología** de neuronas dopaminérgicas y puso de manifiesto un deterioro en la **funcionalidad** de dicho sistema, que se evidenció como un empeoramiento en el desempeño de estos gusanos en un ensayo dependiente de este neurotransmisor, lo cual en la cepa salvaje no pudo ser

revertida por el exceso de dopamina que se esperaría libere etanol. Sin embargo, en cepas que poseen mutaciones en algún componente en la sinapsis dopaminérgica, el etanol logró mayormente revertir en parte este efecto. A su vez, pudo determinarse que los gusanos expuestos a plomo presentaron una mayor **tolerancia** a los efectos sedativos de la droga, y un mayor índice de **preferencia** hacia ésta. Interesantemente, también se demostró que la actividad de la enzima responsable en el gusano de metabolizar etanol a acetaldehído se encontró disminuida como consecuencia de la exposición a plomo, lo que podría condicionar una acumulación de etanol y en consecuencia facilitar la mayor actividad locomotora observada en los gusanos salvajes.

Sobre la base de estos resultados, en el presente trabajo de tesis hemos demostrado los efectos adversos y a largo plazo de una exposición a concentraciones ambientales de plomo sobre respuestas estimulantes y motivacionales a etanol. El modelo y los experimentos realizados han permitido aportar evidencias sobre la importancia del metabolismo de esta droga y del sistema dopaminérgico en estos efectos. Asimismo, hemos podido reproducir la mayor respuesta locomotora y los aumentados efectos motivacionales de etanol que hemos reportado previamente en ratas expuestas a plomo durante el desarrollo.

En conjunto, estas evidencias señalan a *C. elegans* como una plataforma apropiada para el abordaje integral de compuestos farmacológicos diseñados con el fin de disrumpir las conductas asociadas a los desórdenes por el uso de alcohol y a otras drogas de abuso. Además, estos estudios aportan nuevas evidencias a la importancia del empleo de este organismo en estudios mecanísticos de tóxicos de interés ambiental, aun a bajas concentraciones de exposición y sus potenciales efectos adversos en etapas posteriores de la vida.

ABSTRACT

Lead is a persistent non-essential metal in the environment. There is wide evidence of its toxicity and adverse effects on the organism, particularly on the developing central nervous system. Reports in experimental animals relate exposure to this metal to differential responses to certain noxious or aversive situations later in life. Among them, an altered response to drugs of abuse in general, and to ethanol in particular. Ethanol (alcohol) is a drug of abuse that produces motor stimulant effects at low doses due to its action on the dopaminergic system and sedative effects at higher doses, due to its action on the GABAergic and glutamatergic systems.

In the present thesis work, we studied the effect of exposure to low lead levels in early stages of development in *Caenorhabditis elegans* on the dopaminergic system and how it could be manifested in a differential response to the ethanol effects. *C. elegans* is a widely used model organism for the study of toxicity mechanisms. It is a free-living nematode with a fully sequenced genome and a rapid rate of progeny generation and growth.

The studies focused on evaluating the impact of this metal on ethanol metabolism to its first metabolite, acetaldehyde and on addressing the analysis of the motivational effects by using the chemoattraction test, and stimulant effects by the determination of the acute functional tolerance to the sedative effect produced by the ethanol exposure in these worms. The morphology of dopaminergic neurons in response to lead exposure was also evaluated, as well as a behavior test called Basal Slowing Response which is modulated by dopaminergic functionality in the presence or absence of food.

The results obtained in this work demonstrate that exposure to environmentally relevant lead concentrations in the early stages of *C. elegans* development caused a slight alteration in the morphology of dopaminergic neurons and revealed an impairment in the system functionality. This was evidenced as a worsening in the performance of these worms in a test dependent on this neurotransmitter, which in the wild-type strain could not be reversed by the excess of dopamine that would be expected to be released after ethanol exposure. However, in strains possessing mutations in some component at the dopaminergic synapse, ethanol was mostly able to

partially reverse the impairment observed in the wild type strain. In turn, it could be determined that worms exposed to lead showed a greater tolerance to the sedative effects of ethanol, and a higher rate of preference towards this drug. Interestingly, it was also demonstrated that the activity of the enzyme responsible in the worm for metabolizing ethanol to acetaldehyde was found to be decreased as a consequence of lead exposure, an effect that would lead to ethanol accumulation and consequently facilitate the higher locomotor activity observed in the wild type worms.

Based on these results, in the present study we have demonstrated the adverse and long-term effects of environmental concentrations of lead exposure on the stimulant and motivational responses to ethanol. The model and the experiments performed here have provided evidence of the importance of both, the metabolism of this drug and the dopaminergic system in these effects. Likewise, we have been able to reproduce the enhanced locomotor response and the increased motivational ethanol effects that we have previously reported in lead-exposed rats during development.

Taken together, these evidences point out to *C. elegans* as an appropriate platform for a comprehensive approach towards pharmacological compounds designed to disrupt behaviors associated with alcohol use disorders and other drugs of abuse. In addition, these studies provide new evidence for the importance of using this organism in mechanistic studies of toxicants of environmental interest, even at low exposure concentrations and their potential adverse effects later in life.

INTRODUCCIÓN

PLOMO

Plomo como contaminante ambiental

El plomo (Pb) es un metal cuyo uso se remonta a tiempos inmemoriales. Presenta características muy particulares como gran maleabilidad y ductilidad, resistencia a la corrosión, facilidad de fundición y gran abundancia en la naturaleza, por lo cual sus aplicaciones en la industria son muy variadas. Ya desde la antigüedad se utilizaba para generar láminas de escritura; en la edad media se usó para fabricar medallones, fuentes y revestimientos de armazones de madera para las flechas, hasta la actualidad, cuando entre otros usos, se emplea en el área de la construcción, en telecomunicaciones o armamento militar. También se ha usado como antidetonante en naftas, potenciador de color en pinturas, pigmentos y cosméticos y en tuberías de viviendas (Caito & Aschner, 2017; Hernberg, 2000). Dado que es un metal persistente en el ambiente, es decir que no se degrada, y que ha sido liberado de manera sostenida por sus múltiples aplicaciones industriales, se encuentra en el ser humano en niveles trazas como consecuencia de estos usos.

Es considerado un metal no esencial, es decir que no hay procesos fisiológicos en el organismo que dependan de él. Más aun, con el paso del tiempo se ha ido ampliando la evidencia disponible acerca de su toxicidad y los efectos adversos que produce en el organismo. Ya desde la antigüedad, el médico griego Dioscórides afirmaba que el Pb generaba que “la mente vuele” y Benjamin Franklin en el siglo XVIII manifestaba su desconcierto sobre las formas en las que este metal podía seguir generando toxicidad (Major RH, 1931).

Además, al ser persistente, se acumula en el ambiente y en los seres vivos, en los cuales ejerce su toxicidad. En el organismo produce daño en todos los sistemas: renal, hematopoyético, reproductivo y cardiovascular (Mitra y cols., 2017). Pero el efecto adverso más relevante para la salud humana es el que se produce en el sistema nervioso central (SNC) particularmente durante el desarrollo (Vorvolakos y cols., 2016).

El cerebro en desarrollo de los niños es más susceptible y vulnerable respecto al adulto, y esto se debe a las diferencias en la exposición y toxicocinética de la población pediátrica. Específicamente, el sistema gastrointestinal de los niños (que absorbe hasta 5 veces más que el de los adultos), la menor tasa de excreción, la

inmadurez de la barrera hematoencefálica y las costumbres propias de la edad (por ejemplo, gatear y llevarse las manos a la boca) explican por qué la población pediátrica es más propensa y más vulnerable a los efectos del Pb.

Numerosas evidencias han reportado que este metal, incluso en cantidades traza en un organismo en desarrollo, genera una “huella” que perdura a lo largo del tiempo, y que puede evidenciarse en etapas más tardías de la vida, como desafíos fisiológicos, patológicos, o ambientales. Entre ellos puede mencionarse al embarazo, estrés, enfermedades, adicción a drogas o determinadas etapas de la vida que implican procesos biológicos particulares, como la niñez, adolescencia o vejez. Estos eventos podrían potenciar la neurotoxicidad del Pb y serían determinantes para que se manifiesten alteraciones en organismos que estuvieron expuestos tempranamente a este metal (Virgolini & Cancela, 2014; Vorvolakos y cols., 2016).

Por lo mencionado anteriormente, se han establecido regulaciones por parte de los organismos gubernamentales para reducir la exposición a Pb en la población en general, pero particularmente en los niños. Así, en EEUU se prohibió su uso como antidetonante en naftas (la utilización más ubicua) en 1973 y como colorante y secante de pinturas en 1978. En Argentina, estas regulaciones se implementaron más tarde: en 1996 para el caso de las naftas y en 2004 para las pinturas. A pesar de lograr una reducción drástica en los niveles de Pb en sangre en la población general y en particular en los niños (Jones y cols., 2009), este continúa siendo un problema de dimensiones globales.

De forma progresiva, los Centros de Control de Enfermedades de EEUU (US CDC) han reducido los valores considerados “de intervención” de Pb en sangre de niños, desde 60 µg/dl (en 1960) hasta 10 µg/dl (en 1991) (ver figura 1, modificada de Mattalloni y cols., 2014; Virgolini and Cancela, 2014).

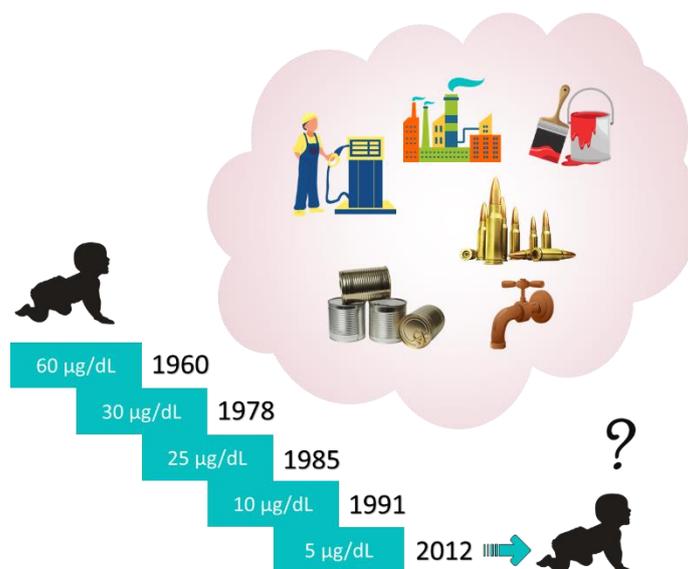


Figura 1. Fuentes de exposición a Pb y descenso a través de los años de los niveles "de referencia" de Pb en sangre en niños establecidos por los US CDC. (Ilustración modificada de Mattalloni y cols., 2014)

En 2012, los US CDC establecieron los niveles de referencia por un valor que se relaciona con los niveles de Pb en sangre del 97,5 % de los niños de 1 a 5 años de EEUU, que en ese momento correspondió a 5 µg/dl (*Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention of the Centers for Disease Control and Prevention, 2012*). Desde entonces, los valores de referencia deberían haber sido revisados cada 4 años, de modo tal que para 2020 en EEUU se estableció como objetivo 1,6 µg/dl para el mismo grupo etario (Dignam y cols., 2019), recomendaciones que no se efectivizaron hasta el momento de la presentación de este trabajo de tesis.

En Argentina existen escasos reportes de los niveles de Pb en sangre de la población pediátrica ambientalmente expuesta. En Córdoba, Hansen y cols realizaron en 1999 un relevamiento sobre los niveles de Pb en niños de 6 meses a 9 años de edad, encontrando que el 26% de la población infantil contenía valores superiores a 10 µg/dl, el nivel de referencia establecido por los US CDC en ese momento (Hansen y cols., 1999). Años más tarde, se realizó un nuevo análisis en una población similar a fin de evaluar el impacto de la regulación y prohibición en el uso del Pb como aditivo en combustibles. Interesantemente, la gran mayoría presentó plumbemias por debajo de 10 µg/dl. Sin embargo, dada la modificación en los niveles de referencia establecidos por los US CDC en 2012, el porcentaje de niños con valores superiores al límite establecido representó el 16,8% de la población total evaluada (Martínez y cols., 2013). Niveles similares se encontraron en la población de la ciudad de La Plata, donde en 2009 se informó que más

del 10% de niños de entre 6 meses y 5 años presentaron niveles de Pb superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Disalvo y cols., 2009). Luego de la implementación de las leyes de regulación, se encontró que para 2016, menos del 3% de los niños presentaban valores de Pb en sangre mayores a 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$, pero el 13% superaba ahora el valor establecido “de referencia” por los US CDC en 2012 (Martins y cols., 2016). Posteriormente, en un estudio realizado en 2015 se determinó que sólo el 3% de esa población presentaba niveles de Pb en sangre superiores a 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (resultados en prensa), revelando el impacto positivo de la implementación de políticas públicas relacionadas a la regulación de los usos de tóxicos ambientales.

A partir de las evidencias planteadas, es de destacar que, si bien las intoxicaciones agudas con altas dosis de Pb son poco frecuentes en la actualidad, la exposición a concentraciones ambientales de este metal es frecuente, siendo los niños la población de mayor vulnerabilidad. Una excepción la constituye el reciente episodio de intoxicación en Flint, Michigan, EEUU, donde aumentó el porcentaje de niños con valores elevados de Pb en sangre debido al reemplazo de la fuente de suministro de agua de consumo, que resultó estar contaminada con este metal (Hanna-Attisha y cols., 2016). Esto generó preocupación a nivel internacional por la falta de protocolos de seguridad orientados a controlar la calidad del agua para consumo humano.

Por todo lo mencionado anteriormente y a pesar del esfuerzo continuo por reducir las fuentes de este metal mediante distintas regulaciones, la contaminación por Pb sigue representando una problemática de salud pública mundial y una preocupación para la comunidad científica internacional.

Toxicocinética

El Pb puede ingresar al organismo por distintas vías. La entrada por inhalación, y en menor medida cutánea, son frecuentes dentro del ámbito laboral, mientras que la digestiva es la que prevalece en la población en general. La fuente de exposición más común se produce a través de los alimentos y el agua. Los adultos absorben entre el 5 y el 15% del Pb que ingieren y retienen normalmente menos de 5% de lo que se absorbe. Los niños en cambio, absorben el 42% del Pb ingerido y retienen un 32%. Además, estos porcentajes pueden ser mayores ante deficiencia de calcio (Ca) o hierro ferroso (Fe),

especialmente en la población pediátrica (Ahamed & Siddiqui, 2007; Mahaffey, 1990; Ziegler y cols., 1978).

Una vez que ingresa el organismo, se distribuye en la sangre, donde puede permanecer hasta un mes. De hecho, el nivel de Pb en sangre es el parámetro bioquímico utilizado como biomarcador de exposición de origen ambiental y ocupacional. Este metal presenta alta afinidad por el grupo hemo (Hem) de los eritrocitos, dada su característica de catión divalente capaz de reemplazar a elementos esenciales divalentes como el Ca, zinc (Zn) y el Fe. Desde el torrente sanguíneo se distribuye inicialmente hacia tejidos blandos como el cerebro, riñón e hígado, donde permanecerá alrededor de 40 días para luego depositarse en pelo y huesos, donde puede mantenerse por años. En los huesos y tejidos duros, sustituye al Ca de la hidroxiapatita y forma un depósito dinámico, que puede liberar nuevamente el metal a la sangre ante condiciones fisiológicas o patológicas, representando hasta un 50% del Pb circulante. Por ello, los huesos constituyen una importante fuente de exposición endógena, particularmente en adultos con acumulación por exposición ocupacional y en mujeres debido a la reabsorción ósea por embarazo, lactancia, menopausia u osteoporosis (Gulson y cols., 2003; Silbergeld y cols., 1988). De esta manera, el Pb puede encontrarse en distintos compartimentos del organismo: es decir los de intercambio rápido (como la sangre); medio (como los tejidos blandos); lento (en la fracción ósea intercambiable de huesos planos y diáfisis de huesos largos) y muy lento (como en los depósitos más profundos de los huesos largos).

Finalmente, se excreta en mayor medida por vía renal a partir de filtración glomerular, mientras que alrededor de un tercio de la excreción total del Pb absorbido se produce por excreción fecal proveniente de las vías biliares (Curtis D. Klaassen, 2008). Otras vías de menor proporción la representan el sudor, lágrimas, saliva, uñas, dientes o leche materna.

Cabe destacar que este metal es capaz de atravesar la barrera placentaria, encontrándose valores en sangre del cordón umbilical que se correlacionan con la plumbemia materna (Al-Jawadi y cols., 2009; Goyer, 1996; Martins y cols., 2014).

Toxicidad

Sobre diversos órganos y sistemas

El Pb puede producir un espectro amplio de efectos adversos en los seres humanos, los cuales dependen tanto de la duración de la exposición como de la dosis. Se han reportado numerosos efectos perjudiciales en todos los sistemas: cardiovascular (Vaziri & Gonick, 2008), renal (Muntner y cols., 2003; Mitra y cols., 2017), óseo (Pounds y cols., 1991), hematopoyético (Vij, 2009), inmune (Theron y cols., 2012), respiratorio (Mitra y cols., 2017), gastrointestinal (Janin y cols., 1985), endócrino (Selevan y cols., 2003) y reproductivo (Lamadrid-Figueroa y cols., 2007; Morán-Martínez y cols., 2013; Vigeh y cols., 2011).

Si bien los mecanismos moleculares subyacentes de estos efectos sistémicos no se han dilucidado completamente, la generación de estrés oxidativo (EO) y el desbalance con el sistema antioxidante parece ser el factor unificador en la patogénesis de varias manifestaciones perjudiciales de la exposición a este metal (Patrick, 2006). A pesar de que no es un metal redox activo, el Pb produce la generación de radicales libres mediante dos vías alternativas, aunque relacionadas una con otra: por un lado, a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs), como hidropéroxidos, oxígeno singlete y peróxido de hidrógeno y por el otro, a través de la depleción directa de las reservas antioxidantes. En cuanto a las enzimas antioxidantes, éstas son metaloenzimas susceptibles a la competencia del Pb por el sitio del metal o a la inhibición del grupo tiol. A su vez, la disminución del péptido glutatión (GSH), principal componente antioxidante no enzimático, también puede resultar disminuido como consecuencia de una inhibición de grupos tioles por parte de dicho metal (Patrick, 2006; Virgolini y cols., 2019).

Este desbalance redox causa inflamación en células endoteliales, daño a ácidos nucleicos, inhibe la reparación del ADN e inicia el proceso de peroxidación lipídica en membranas celulares, alterando su integridad, permeabilidad y funcionalidad (Patrick, 2006), efectos que explican las alteraciones que produce en todos los sistemas del organismo.

En el sistema nervioso

El Pb causa daños al sistema nervioso a través de diferentes maneras. A nivel morfológico altera el desarrollo neural, principalmente desde el período prenatal hasta la infancia. Numerosos mecanismos pueden explicar este fenómeno: interferencia en la formación de sinapsis (Cookman y cols., 1987), diferenciación prematura de células gliales o perturbación de las moléculas implicadas en la migración y diferenciación neuronal (Monnet-Tschudi y cols., 2006; Zurich y cols., 2002), alteración del metabolismo energético celular (Baranowska-Bosiacka y cols., 2017), inducción de procesos apoptóticos (He y cols., 2000; Mason y cols., 2014), alteración en la regulación de la transcripción de genes (Stansfield y cols., 2012), e incluso aumento de la peroxidación lipídica y modificaciones ultraestructurales en cerebro (Zhang y cols., 2009).

Por otro lado, el Pb como un agente neurotóxico puede interferir en la liberación de neurotransmisores, interrumpiendo la función de los sistemas dopaminérgicos, GABAérgicos o colinérgicos (Davis, 1990; Devoto y cols., 2001). Dentro de la célula, este metal puede actuar como un sustituto del Ca en el metabolismo de segundos mensajeros (Goldstein, 1993) o incluso interferir con la liberación del Ca de las mitocondrias (Simons, 1986), dando lugar a la formación de EROs, acelerando el daño mitocondrial, y facilitando la activación de procesos apoptóticos (Brookes y cols., 2004).

Las intoxicaciones a altas concentraciones del metal y sus efectos sobre el SNC se presentan asociadas a neuropatías periféricas en adultos, con manifestaciones físicas patognomónicas que generalmente están relacionadas con intoxicaciones profesionales (Kumar y cols., 1987; Schwartz y cols., 2000), en tanto que las encefalopatías producto de la exposición a altos niveles de este metal en niños son raras y van acompañadas de convulsiones, edema cerebral y muerte (Bose-O'Reilly y cols., 2018; Hershko y cols., 1984; Talbot y cols., 2018; World Health Organization, 2010).

Sin embargo, las manifestaciones actuales más relevantes de los efectos adversos resultantes de la exposición a Pb son las que se producen a niveles bajos asociados con su presencia en el ambiente, resultando en efectos subclínicos, en particular en organismos en desarrollo. Se ha reportado que la exposición a niveles ambientales de Pb produce deficiencia del desarrollo neurológico (Cecil y cols., 2008,

2011) y disminución del coeficiente intelectual en niños (Lanphear y cols., 2005), los que se traducen en déficits cognitivos o de atención, relacionándose con el trastorno de déficit de atención (TDAH) (Braun y cols., 2006; Froehlich y cols., 2009; Nigg y cols., 2010), alteraciones en el aprendizaje (Canfield y cols., 2004; Grönqvist y cols., 2017; Magzamen y cols., 2015), hiperactividad o problemas de conducta como agresión y delincuencia (Bellinger y cols., 2018; Grönqvist y cols., 2017; Taylor y cols., 2016). Más aun, se encontró una correlación positiva entre la exposición prenatal al Pb con el comportamiento delictivo y el uso de drogas en la adolescencia (Dietrich y cols., 2001; Needleman y cols., 2002).

Estas evidencias son las que confirman que este metal produciría una huella biológica en los sistemas de neurotransmisión, que condicionará una serie de cambios en la funcionalidad del SNC y que modificará futuras respuestas a agentes químicos o eventos desafiantes de la vida.

Efectos sobre el sistema dopaminérgico

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que se genera a partir de la hidroxilación de la tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la cual es saturable, por lo tanto, es el paso limitante en el proceso de formación del neurotransmisor. La enzima L-DOPA descarboxilasa elimina un residuo carboxilo de la L-DOPA, y se genera así DA, que es transportada al interior de vesículas citoplasmáticas por el transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (por sus siglas en inglés, *vesicular monoamine transporter type-2*, VMAT2) para evitar su autooxidación (Jones & Miller, 2008). El transportador de DA (DAT) presente en el terminal de las neuronas presinápticas recapta la DA desde el espacio sináptico hacia el interior celular, donde será almacenada en las vesículas a través de VMAT2 para su futura liberación. Estos sistemas actúan de manera coordinada para prevenir el exceso de DA en la hendidura sináptica y en el citoplasma, impidiendo su auto oxidación y la consecuente generación de EROs.

La DA que no se almacena es metabolizada en el citoplasma por la enzima monoamino oxidasa (MAO) a 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) y por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) que, a su vez, puede ser metabolizado a ácido homovanílico (HVA) por la catecol-o-metil transferasa

(COMT). Dependiendo del tipo de receptor al cual se une la DA, ésta puede ejercer efectos estimulantes o inhibitorios. Los receptores DAérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G y contienen 7 dominios transmembrana (Vallone y cols., 2000). Hasta el momento se han descrito 5 tipos de receptores DAérgicos en el ser humano que se dividen en dos grandes grupos: receptores tipo D1 (D1R) y tipo D2 (D2R) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Lindgren y cols., 2003). Los receptores D1 y D5 pertenecen a los D1R, y la unión de DA a estas proteínas desencadenará una cascada de señales estimulantes en las neuronas postsinápticas mediante la activación de la adenilciclase (AC) y el aumento de la producción de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc). Por otro lado, los receptores D2, D3 y D4, que pertenecen a los D2R, inhiben a la AC y en consecuencia disminuye la producción de AMPc (efecto inhibitorio sobre neuronas pre y postsinápticas). Cabe destacar que la activación de D2R sobre las neuronas presinápticas ejerce un efecto de retroalimentación negativo, puesto que la inhibición de AC causa una disminución de la actividad de TH con la consiguiente disminución en la formación de DA (Lindgren y cols., 2003).

La neurotransmisión DAérgica participa en procesos de memoria, motivación, recompensa, locomoción, adicción, entre otros (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Diversas investigaciones han aportado evidencias señalando al sistema DAérgico como un posible sitio blanco en la neurotoxicidad inducida por Pb (Cory-Slechta, 1995; Cory-Slechta & Widzowski, 1991; NourEddine y cols., 2005; Pokora y cols., 2002; Tavakoli-Nezhad y cols., 2001). Más aun, se han reportado múltiples blancos DAérgicos sensibles a la acción tóxica del Pb, que pueden ser afectados simultáneamente, aumentando la vulnerabilidad de la neurotransmisión DAérgica a la toxicidad de este metal (White y cols., 2007). Particularmente, NourEddine (2005) reportó que 1000 ppm de Pb en ratas durante el desarrollo produce una disminución de la síntesis y liberación de DA, así como una inhibición del receptor postsináptico D2 (NourEddine y cols., 2005). Tavakoli-Nezhad demostró que la exposición postnatal a Pb disminuye la tasa de disparo de neuronas DAérgicas en cerebro medio (Tavakoli-Nezhad y cols., 2001). Por su parte, Cory-Slechta (1995) reportó que el Pb afecta a diversos procesos en el sistema DAérgico, como la síntesis y la recaptación de DA, así como el número y la función de los receptores de DA (Cory-Slechta 1995). Por otro lado, Pokora y cols (2002) demostraron que la exposición a bajos niveles de Pb en el período posnatal disminuye los sitios de unión a

DA preferentemente en núcleo accumbens (NAc), un área estrechamente relacionada con el circuito de recompensa (Pokora y cols., 2002).

Cabe destacar que diferentes mecanismos pueden subyacer a la exposición a Pb y variar en función del período del desarrollo en el que se produce dicha exposición, afectando la magnitud y la dirección de los efectos del Pb, los cuales estarán también condicionados por la dosis, la duración de la exposición y el modelo animal utilizado (Verstraeten y cols., 2008).

Plomo y adicción a drogas

Diversos factores como la disponibilidad de una droga, variables genéticas, eventos estresantes, o determinados estímulos asociados al consumo pueden predisponer la transición del uso de drogas hacia el abuso de estas sustancias (Volkow & Li, 2004). Más aun, la exposición a toxinas como el Pb, estaría jugando un rol en este proceso (Jones & Miller, 2008).

Existen numerosos reportes en animales de experimentación que relacionan la exposición a Pb, tanto en la edad temprana como adulta, con respuestas diferenciales ante determinadas noxas o situaciones aversivas en etapas posteriores de la vida.

A este respecto, se ha demostrado que este metal genera un aumento no sólo del nivel basal de corticosterona (hormona que se libera ante situaciones de estrés en roedores, y de función análoga al cortisol en humanos), sino también de su liberación ante determinados estresores, lo que referiría a una mayor reactividad de individuos expuestos a Pb ante situaciones estresantes (Cory-Slechta y cols., 2004; Virgolini y cols., 2004). En concordancia con estos resultados, Haider y cols demostraron el mismo efecto ansiogénico cuando se administró Pb en la etapa adulta (Haider y cols., 2013).

En otras evidencias se ha reportado que animales expuestos a este metal, ya sea en etapa adulta como durante el desarrollo, manifiestan una respuesta diferencial frente a drogas de abuso como cocaína (Nation y cols., 2003, 2004; Rocha y cols., 2005), etanol (EtOH) (Correa y cols., 2000; Mattalloni y cols., 2013; Virgolini y cols., 1999), anfetamina (Virgolini y cols., 2004) y opioides como morfina (Baranowska-Bosiacka y cols., 2016; Listos y cols., 2013) o metanfetamina (Rocha y cols., 2008). Estas evidencias sientan las bases de la hipótesis que relaciona la exposición a Pb con una mayor vulnerabilidad del SNC a drogas de abuso.

En cuanto a estos efectos en animales de experimentación, se ha demostrado una mayor respuesta locomotora ante una dosis de anfetamina coincidente con el mayor nivel de corticosterona en animales expuestos a Pb durante el desarrollo (Virgolini y cols., 2004). Estos efectos pueden deberse a los que produce el Pb tanto sobre el sistema DAérgico (Cory-Slechta & Widzowski, 1991; Gupta & Gill, 2000; Jones & Miller, 2008) como en la regulación de los niveles de corticosterona (Cory-Slechta y cols., 2004, 2008; Haider y cols., 2013; Virgolini y cols., 1999, 2004).

En relación a cocaína, se reportó que la exposición prenatal a Pb incrementó el nivel de autoadministración de la droga en un paradigma de conducta operante (Rocha y cols., 2005). Efectos similares se obtuvieron al evaluar el comportamiento frente a derivados opioides. Cuando la exposición al metal se produjo durante el desarrollo, se observó un aumento en la locomoción en respuesta a morfina (Miller y cols., 2000). Respecto a las propiedades reforzantes de dicha droga, se reportó que el Pb durante el desarrollo generó síntomas de abstinencia más pronunciados así como una mayor tolerancia (Baranowska-Bosiacka y cols., 2016; Listos y cols., 2013), lo que sugeriría un papel potenciador de la exposición perinatal a Pb en el desarrollo de la dependencia a la morfina.

Las evidencias mencionadas ponen de manifiesto que los animales expuestos a Pb durante el desarrollo presentan una reactividad diferencial a los efectos adictivos de las drogas, lo cual podría estar vinculado a una alterada funcionalidad de los sistemas relacionados a las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, incluyendo al DAérgico.

En la próxima sección se abordará el estudio del EtOH, una droga de abuso que, al igual que otras sustancias, favorece la liberación de DA en el circuito de la recompensa.

ETANOL

Es conocido que el alcohol etílico o EtOH, es una droga de venta libre, de consumo masivo y de gran aceptación por la población en general, principalmente entre los jóvenes. La iniciación del consumo en este periodo implica consecuencias adversas en la salud a corto y largo plazo, y puede converger en desórdenes del uso del alcohol

(*alcohol use disorders*, por sus siglas en inglés, AUD), lo que supone importantes costos económicos y sanitarios para la sociedad (revisado en Smit y cols., 2018). El uso y abuso de EtOH contribuye a múltiples complicaciones médicas, como daño en diversos órganos y sistemas. Su consumo también representa un problema durante el embarazo, ya que da lugar al espectro del síndrome fetal del alcoholismo, la forma más común de discapacidad mental causada por EtOH y que afecta a 7 de cada 1000 niños (Niccols, 2007). Distintos programas de investigación, como el abordado por el Instituto Nacional del Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) se focalizan en una mejor comprensión de los efectos adversos y del consumo excesivo de esta droga (www.niaaa.nih.gov). En la última revisión de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2018), se informó que en el 2016, el consumo nocivo de alcohol causó unas 3 millones de muertes (5,3% del total de muertes registradas) en el mundo. De esas, 2,3 millones se atribuyeron a los hombres y 0,7 millones a las mujeres. La mortalidad resultante por consumo de alcohol fue mayor que la causada por enfermedades como la tuberculosis, la infección por el VIH/SIDA y la diabetes. Los jóvenes fueron más afectados por el alcohol que las personas mayores, ya que el 13,5% de las muertes entre los 20 y los 39 años se atribuyeron al alcohol (World Health Organization, 2018).

El uso y el abuso de esta droga no sólo genera consecuencias perjudiciales para la salud física y mental de las personas afectadas (Nutt y cols., 2007) sino que también produce graves repercusiones sociales y económicas, ocasionando que a escala mundial el 10% del producto bruto de una nación industrializada se gasta en relación con el uso y abuso de esta sustancia (Spanagel, 2009).

Toxicocinética

En organismos superiores, el EtOH ingresa principalmente por vía oral y por el tracto gastrointestinal llega hasta el estómago, donde se absorbe alrededor del 20%, y finalmente hasta el intestino delgado, sitio donde será absorbido el 80% restante (Zakhari, 2006). Una vez en sangre, por la vena porta alcanza el hígado, donde es oxidado en un proceso de dos pasos. En primer lugar, se transforma a acetadehído (ACD) principalmente por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), y luego a ácido acético por la ALDH isoforma 2 (ALDH2). Ambas reacciones son dependientes de la reducción del cofactor de nicotin adenin dinucleótido (NADH), por lo tanto, la reoxidación de este

compuesto en el complejo I mitocondrial es el paso limitante de la reacción. Si bien el ACD se oxida a ácido acético por acción exclusiva de la ALDH2, el primer paso de EtOH a ACD puede ser llevado a cabo no sólo por ADH sino también por la enzima microsomal CYP2E1 (Ramchandani y cols., 2001). CYP2E1 pertenece al complejo enzimático citocromo P450 y al ser inducible, cobra relevancia en situaciones de consumo crónico de EtOH o cuando existen altas concentraciones de la droga en sangre (Montoliu y cols., 1994, 1995; Sun y cols., 2001). Otra vía de metabolización hepática que se da en menor medida es por la enzima antioxidante catalasa (CAT) cuando existe consumo crónico de EtOH debido a la generación de H₂O₂ en regiones del hígado, lo que induce una mayor actividad de esta enzima (Misra y cols., 1992).

Es importante mencionar que una fracción del EtOH circulante puede penetrar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) por su capacidad de atravesar las membranas biológicas. Además, cabe destacar que el ACD generado en hígado no ingresaría al SNC debido a la alta actividad de ALDH hepática y a la presencia de esta enzima en la células endoteliales de la BHE (Zimatkin, 1991). Por lo tanto, sólo bajo condiciones de intoxicación grave ingresarían pequeñas cantidades de ACD sistémico al SNC. Dado que la isoenzima de ADH responsable de metabolizar al EtOH no está presente en cerebro en cantidades sustanciales (Galter y cols., 2003), éste se metaboliza *in situ* a ACD en un 70% por la enzima CAT (Aragon y cols., 1992; Jamal y cols., 2007; Smith y cols., 1997) mientras que entre el 10 y 20% se metaboliza por CYP2E1 (Zimatkin y cols., 1998, 2006). Posteriormente, y al igual que en el hígado, se transforma a ácido acético por la enzima ALDH (ver figura 2).

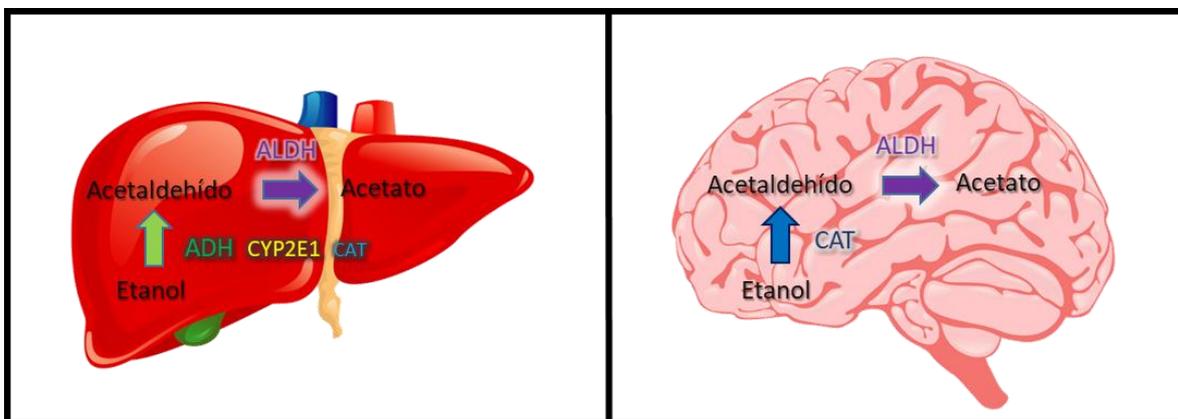


Figura 2. Metabolismo del etanol: órganos y enzimas implicadas.

En cuanto al ACD, se ha descrito que su presencia a nivel periférico está asociada con los síntomas aversivos que produce el alcohol, conocido como “*flushing*”, que se manifiesta como dolor de cabeza, enrojecimiento facial, náuseas, etc. En relación a esto, las primeras terapias orientadas al tratamiento del alcoholismo se basaron en favorecer la acumulación de este metabolito en sangre. El disulfiram, inhibidor de ALDH, exacerba los síntomas de aversión al ACD y, por tanto, es considerada una droga disuasiva para el consumo de EtOH (Hald & Jacobsen, 1948).

Sin embargo, existe una cantidad importante de estudios, como se mencionará más adelante, que proponen que el ACD generado a nivel cerebral por la enzima CAT exhibe propiedades motivacionales y reforzantes y participan en mayor o menor medida en los efectos placenteros y reforzantes que genera el EtOH.

Efectos del etanol

El consumo y abuso del EtOH genera una multiplicidad de complicaciones en el organismo. La Organización Mundial de la Salud reportó en 2018 una serie de consecuencias médicas en las que el uso problemático de alcohol tuvo incidencia (World Health Organization, 2018). Esta es una droga que tiene el potencial de afectar prácticamente a todos los órganos y procesos bioquímicos del cuerpo humano.

El EtOH produce daños en las células y órganos como resultado de la generación de radicales libres, alteración endócrina, o cambios en las membranas plasmáticas celulares (Goldstein, 1986; Nordmann y cols., 1992; Van Thiel & Gavaler, 1990). Si bien a nivel periférico el principal órgano afectado es el hígado (Lieber y cols., 2004), esta droga produce efectos nocivos en otros órganos y sistemas, como el cardiovascular (Hillbom, 1999; Kolovou y cols., 2006), gastrointestinal (*Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Alcohol Drinking*, 1988), reproductivo (Li y cols., 2003), entre otros. El metabolismo oxidativo del EtOH por ADH y ALDH genera un incremento en la demanda de oxígeno, y en consecuencia un desbalance redox del organismo en general.

A nivel del SNC, el EtOH es considerado un depresor no selectivo que genera efectos bifásicos y opuestos: durante el escalamiento de los niveles de alcohol en sangre se producen efectos estimulantes motores y ansiolíticos (euforia, relajación y desinhibición) que a dosis mayores son reemplazados por sus efectos sedantes (Hendler

y cols., 2013; Pohorecky, 1977). En numerosos estudios en animales se ha intentado determinar el mecanismo de acción que explique las propiedades del EtOH, sin embargo, las bases neurobiológicas aún no están totalmente dilucidadas. Esto se debe a que esta droga presenta un mecanismo de acción muy complejo que produce cambios en la composición lipídica de las membranas y actúa tanto de manera directa como indirecta, interfiriendo con proteínas receptoras o efectoras de la mayoría de los sistemas de neurotransmisión (DA, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato (GLU), péptidos opioides y adenosina), incluso a altas concentraciones (Acquas y cols., 2019). Además, es conocido que el EtOH a dosis bajas facilita la liberación de DA y GLU (Gass & Olive, 2008; Moghaddam & Bolinao, 1994; Szumlinski y cols., 2007), neurotransmisores relacionados con las propiedades reforzantes y estimulantes de drogas de abuso, mientras que a dosis altas la liberación de GLU disminuye (Gass & Olive, 2008; Moghaddam & Bolinao, 1994; Piepponen y cols., 2002; Yan y cols., 1998), lo que produce analgesia e interviene una activación del sistema GABAérgico (Mihic y cols., 1997; Tabakoff & Hoffman, 2013), que genera sedación e inhibe la liberación inicial de DA.

En base a estas evidencias, el EtOH ejercería su acción primaria a través de varios sistemas de neurotransmisión/neuromodulación del SNC, que incluye al receptor glutamatérgico NMDA, el GABA_A, el receptor de glicina, el receptor serotoninérgico 5-HT₃ y los receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh) (revisado en Vengeliene y cols., 2008). Las diferencias innatas en el funcionamiento de estos sistemas cerebrales, que definen las propiedades de reforzamiento del EtOH, contribuyen a una respuesta individual a esta droga.

En conclusión, los efectos psicotrópicos agudos del EtOH están mediados por la compleja interacción con los diversos sistemas de neurotransmisión anteriormente mencionados. Tras el “primer golpe” de esta sustancia, se inicia una segunda ola de efectos indirectos en diversos sistemas de neurotransmisores/neuropéptidos, lo que conduce finalmente a efectos conductuales del EtOH, que van desde la desinhibición a la sedación (Spanagel, 2009; Vengeliene y cols., 2008).

Se ha relacionado a la fase de adquisición del consumo de drogas con sus efectos reforzantes positivos, es decir, los efectos placenteros que promueven el consumo reiterado de la sustancia y que se experimentan inicialmente durante la ingesta de la

droga, proceso mediado por la estimulación de las neuronas DAérgicas del circuito mesocorticolímbico. Esta área cerebral se encuentra localizada en la parte anterior del cerebro y está conformado por las proyecciones de neuronas DAérgicas cuyos somas se ubican en el área tegmental ventral (ATV) y proyectan hacia el NAc. Este sistema actúa como un circuito motivacional que traduce los estímulos biológicos y farmacológicamente relevantes en respuestas conductuales (Douaihy & Glance, 2013; Koob & Volkow, 2016).

La neurotransmisión DAérgica en el sistema mesocorticolímbico es modulada, entre otros, por el receptor μ -opioide (MOR; también conocido como MOR1), que se encuentra en la membrana de interneuronas GABAérgicas. El tono inhibitorio que ejercen estas interneuronas sobre los cuerpos celulares DAérgicos de ATV, es impedido por la activación de MOR en las neuronas del GABA por medio de opiáceos endógenos, lo que en última instancia resulta en un aumento de la liberación de DA. Se ha demostrado que el EtOH induce la liberación de opiáceos endógenos y por lo tanto impulsa la liberación de DA en NAc (ver figura 3), generando como consecuencia una activación del sistema DAérgico mesolímbico, proceso clave para sus efectos reforzantes (Ben Hamida y cols., 2017; Heilig y cols., 2011; Xiao y cols., 2007).

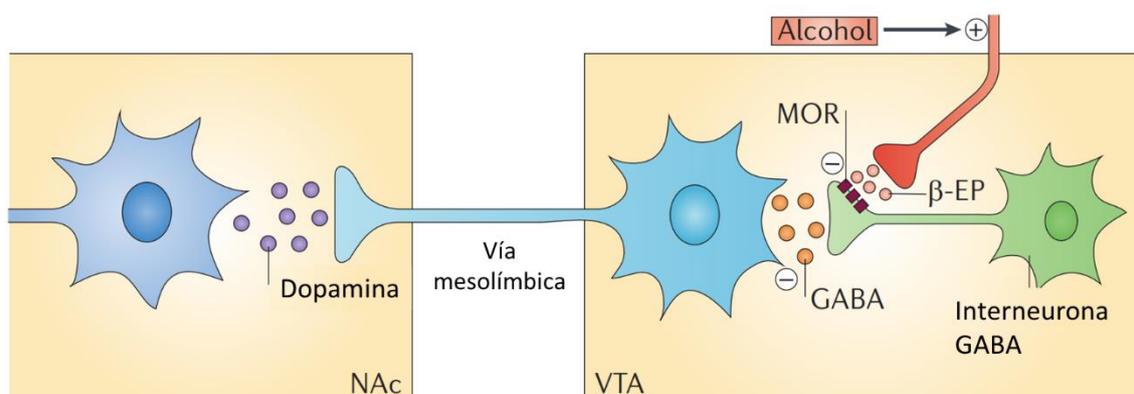


Figura 3. Mecanismo de acción del EtOH por el que se induce la liberación de DA en el sistema mesocorticolímbico. (Ilustración modificada de Heilig y cols., 2011)

Entre las evidencias que apoyan el rol de los sistemas DA y opioide endógeno en la modulación de las propiedades estimulantes y reforzantes de EtOH, se ha descrito que tanto EtOH como ACD estimulan a las neuronas DAérgicas de ATV, lo cual es prevenido por el tratamiento con 4-metilpirazol (inhibidor de la formación de ACD) (Foddai y cols., 2004) o penicilamina, (Enrico y cols., 2009), un agente quelante de ACD. Se ha demostrado además que ACD *per se* es un potente reforzador cuando es

autoadministrado en ATV en ratas que naturalmente prefieren EtOH (Rodd-henricks y cols., 2002). Asimismo se ha demostrado que microinyecciones de EtOH o ACD en ATV posterior resultaron en un aumento de la actividad locomotora en ratas, la cual fue suprimida por el bloqueo de los receptores opioides con el antagonista no selectivo naltrexona o el antagonista selectivo de receptores μ -opioides, β -funaltrexamina (Sánchez-Catalán y cols., 2009). Inclusive, antagonistas opioides no selectivos administrados sistémicamente son capaces de reducir de una manera dosis-dependiente la actividad locomotora inducida por EtOH en ratones (Camarini y cols., 2000; Sanchis-segura y cols., 2004), sugiriendo que el sistema opioidérgico (particularmente el μ -opioide) juega un rol crucial en la activación locomotora inducida por EtOH y sus derivados (Hall y cols., 2001; Pastor y cols., 2005).

Etanol como droga de abuso

Trastornos de uso compulsivo de etanol: concepto de adicción, reforzamiento y factores de riesgo asociados.

La adicción se define como un estado en el que el consumo de drogas condiciona todas las actividades de la vida del usuario. El paciente adicto puede perder la compatibilidad social (por ejemplo, la pérdida de la pareja y los amigos, la pérdida del trabajo, la ejecución de un delito) (Spanagel, 2009). El trastorno de uso compulsivo de EtOH surge de una compleja red de factores individuales, sociales, culturales y biológicos.

Las características conductuales del AUD incluyen el uso compulsivo de EtOH, el deseo de consumir esta droga y las recaídas crónicas que pueden ocurrir incluso después de años de abstinencia. Este trastorno está definido por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)”, 2013) y por la Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Disease*, por sus siglas en inglés, ICD) en función de un criterio operacional: el uso continuado de EtOH, a pesar de las consecuencias negativas psicológicas, biológicas, conductuales y sociales, un determinado número de veces dentro de un período de 12 meses, califica para este diagnóstico. Si se cumple más de uno de los criterios establecidos, el trastorno por consumo de alcohol se diagnostica

según el DSM-5, y la gravedad se mide por el número de criterios cumplidos. En el ICD-11, estos trastornos se diagnostican como "dependencia del alcohol" o como un "patrón nocivo de consumo de alcohol", en la cual la dependencia es la manifestación más severa (Carvalho y cols., 2019; Saunders y cols., 2019; World Health Organization, 1992).

El AUD representa un trastorno crónico, progresivo y recidivante que avanza desde la experimentación inicial con la droga hasta la dependencia al consumo de la misma (Heilig & Egli, 2006; Koob & Le Moal, 2008; Koob & Volkow, 2010; Spanagel, 2009). La iniciación incluye borracheras acompañada de desinhibición y comportamiento pro-social, y respuestas autonómicas (como aumento del ritmo cardíaco). Esta sensación placentera y de euforia se traduce en un *reforzamiento positivo* del consumo de EtOH, que se experimenta en las etapas iniciales de consumo, lo que aumenta la probabilidad, frecuencia y magnitud de la conducta del consumo subsiguiente.

Durante la abstinencia de EtOH y posterior al consumo crónico, se produce disforia (en contraposición a la euforia) que se manifiesta como ansiedad. Estos efectos disfóricos pueden ser de naturaleza fisiológica (por ejemplo, hipertermia, taquicardia, síntomas de resaca, etc.) o asociados a secuelas de comportamientos sociales negativos en búsqueda de la droga; el aumento de los síntomas de disforia determina que el individuo intenta aliviar este estado recurriendo al EtOH nuevamente. Esto explica que esencialmente durante las primeras etapas del AUD predomine el refuerzo positivo, mientras que en las etapas posteriores del AUD adquiera preponderancia el *refuerzo negativo* (Koob & Le Moal, 2008; Koob & Volkow, 2010, 2016).

Como se dijo previamente, si bien las variables genéticas cobran especial relevancia, el hecho de que las tasas de concordancia sean menores al 50%, indicaría que factores de riesgo ambientales e interacciones genético-ambientales también contribuyen a la aparición y persistencia de estos trastornos (Carvalho y cols., 2019).

Entre los múltiples factores que pueden predisponer a que un individuo desarrolle un AUD, se han identificado variaciones en alelos de las enzimas implicadas en el metabolismo del EtOH: la ADH (media la oxidación de EtOH a ACD a nivel periférico) y la ALDH2 (que convierte el ACD en ácido acético, tanto a nivel periférico como central). Se conocen dos alelos distintos de esta última enzima: ALDH2*1 y ALDH2*2. Al respecto, portadores del alelo 2 desarrollan un metabolismo alterado del EtOH con una

acumulación de ACD a nivel periférico que se ve impedido de metabolizarse por inactividad de la enzima. Los efectos adversos incluyen dolor de cabeza, enrojecimiento, sudoración, náuseas y vómitos, o taquicardia, todos efectos que reducen la probabilidad de desarrollar AUD (Li y cols., 2012; Peng & Yin, 2009). Este polimorfismo es poco frecuente en países europeos pero puede llegar a alcanzar hasta un 40 % en algunas poblaciones de Asia del Este (Li y cols., 2009). Por otro lado, polimorfismos en la ADH (como ser la portación de la isoforma ADH1B*2) también protegen contra el desarrollo de AUD (Peng & Yin, 2009; Tawa y cols., 2016).

Respecto a variables medioambientales, se sabe que diversas toxas como pesticidas (paraquat, rotenona, organoclorados), disruptores endócrinos (por ejemplo Bisfenol A) o metales pesados (Mn, Pb, cadmio[Cd]) pueden predisponer a una alterada vulnerabilidad al consumo de drogas a través de alteraciones del sistema de neurotransmisión DAérgico (revisado en Jones and Miller, 2008).

En este sentido, adquiere relevancia en esta tesis estudiar la influencia que podría ejercer la exposición a Pb en el desarrollo en las respuestas al EtOH.

Teorías sobre los mecanismos neurobiológicos que median los efectos del etanol

Estudios recientes se enfocan tanto en el efecto que ejerce el EtOH sobre el SNC como también en la participación de sus metabolitos en los efectos motivacionales de esta droga. Más aun, existen teorías extremas y otras más moderadas que difieren sobre cuál sustancia sería la responsable de las propiedades reforzantes de las bebidas alcohólicas: si el EtOH *per se* o el ACD formado a nivel cerebral.

Por una parte, se sostiene que es el EtOH quien ejerce sus propiedades en el SNC afectando a numerosos sistemas de neurotransmisión, puesto que no se ha demostrado que el ACD cruce la BHE y además que éste se produce en concentraciones que serían insuficientes para mediar los efectos de la intoxicación por EtOH (Deitrich, 2004; Peana & Acquas, 2013).

Sin embargo, quienes apoyan la teoría del ACD cerebral como responsable de los efectos reforzantes del EtOH, aducen que este último actuaría como una “pro-droga”, sugiriendo que sus propiedades activadoras se deben a las acciones centrales de sus metabolitos, independientemente de que su generación se produzca de manera central o periférica (Karahanian y cols., 2015; Quertemont y cols., 2005). En este último caso,

según esta teoría, los niveles plasmáticos de ACD tras la ingestión de EtOH alcanzarían concentraciones suficientes para actuar significativamente sobre neuronas del SNC (Raskin, 1975). La teoría más conciliadora se sitúa entre las dos anteriores, y plantea que los efectos son mediados por el propio EtOH en combinación con sus metabolitos producidos en el cerebro a partir del metabolismo local del EtOH, y que ambas partes actuarían sobre el sistema DAérgico mesolímbico de manera sinérgica (Deehan y cols., 2013; Peana y cols., 2017; Quertemont & Didone, 2006).

Por otro lado, se plantea el interrogante sobre cuál es el mecanismo concreto mediante el cual el ACD podría ejercer sus propiedades reforzantes, dado que su vida media es corta y que no existen hasta el momento receptores específicos para este metabolito. Sobre este campo ha cobrado relevancia la participación del salsolinol (SAL), una tetrahydroisoquinolina que se forma por condensación enzimática o no enzimática (reacción de Pictet-Spengler) de DA y ACD. El SAL (1-metil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina) es una sustancia endógena que puede formarse en cerebro, líquido cerebro espinal, sangre y orina (Naoi, 2004), llevando a una formación racémica de los enantiómeros (R) y (S) (Melchior y cols., 1982; Mozdzeń y cols., 2015; Musshoff y cols., 2000). Quintanilla y cols demostraron que el enantiómero (R) (y no así el [S]), induce preferencia condicionada a un sitio, sensibilización locomotora y un marcado incremento del consumo voluntario de EtOH (Quintanilla y cols., 2016). Más aun, se observó que SAL, al igual que EtOH y ACD, posee propiedades reforzantes, incluso a dosis mucho menores que éstos (Rodd y cols., 2008). Además, su administración sistémica indujo preferencia condicionada a un sitio, que fue atenuada por el bloqueo de receptores μ y δ -opioides (Hipólito y cols., 2011; Matsuzawa y cols., 2000). Incluso, cuando fue inyectado en ATV posterior indujo hiperlocomoción (Hipólito y cols., 2010), preferencia condicionada a un sitio, e incrementó los niveles de DA en NAc, lo que fue prevenido por un antagonista de receptores μ -opioides, apoyando la hipótesis de la implicancia de estos receptores en los efectos derivados de SAL (Hipólito y cols., 2011). En relación a esto, resultados obtenidos por experimentos *in vitro* demostraron que SAL, al igual que EtOH y ACD, exacerba la tasa de disparo de neuronas DAérgicas de ATV (Melis y cols., 2015; Xie y cols., 2012), y que efectivamente es capaz de activar receptores μ -opioides, en las mismas dosis en las que ejerce sus efectos neuroquímicos y conductuales (Berríos-Cárcamo y cols., 2017, 2019).

Estos resultados apoyarían tanto la participación de SAL en la activación de neuronas DAérgicas de ATV luego de la administración de EtOH, como la idea de que éste sería un efecto indirecto mediado por la activación de receptores μ -opioides localizados en las neuronas GABA de ATV (Acquas y cols., 2019; Cavallaro y cols., 2018; Melis y cols., 2015).

En secciones anteriores, se ha mencionado el rol del sistema opioidérgico en las respuestas al EtOH y ACD cuando éstos son administrados en áreas límbicas.

PLOMO Y ETANOL

Es conocido que tanto Pb como EtOH son neurotóxicos que pueden actuar de manera sinérgica. Numerosas investigaciones avalan la existencia de una interacción entre la exposición al Pb y esta droga de abuso.

A nivel bioquímico, Flora y cols reportaron evidencias de que la coexposición a estos neurotóxicos produce una elevación pronunciada de la peroxidación lipídica hepática, depleción de los niveles sanguíneos de Ca y Mg y aumento de la plumbemia; incluso el EtOH potenciaría el efecto tóxico producido por Pb en el hígado y en el sistema hematopoyético (Flora y cols., 1991). A su vez, el mismo grupo de investigación reportó en 2012 que la exposición concomitante a dosis de 10% de EtOH y 0,1% de acetato de Pb en el líquido de bebida provoca alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidante (disminución de actividad de enzimas como CAT y superóxido dismutasa, reducción en los niveles de glutatión peroxidasa), así como un aumento sinérgico en la generación de EO y marcadores proapoptóticos (Flora y cols., 2012), todo lo cual puede producir neurodegeneración mediada por EO debido a la presencia concomitante de ambos tóxicos.

A nivel conductual, se ha demostrado que el Pb administrado en la etapa adulta genera una atenuación en los efectos del EtOH, ya sea por una menor tasa de palanqueo en un esquema de autoadministración oral (Nation y cols., 1991), como una atenuación de la analgesia dependiente de la dosis producida por la droga (Burkey y cols., 1994). Sin embargo, en un esquema de consumo voluntario de alcohol, animales adultos expuestos a Pb mostraron una ingesta incrementada (Nation y cols., 1986), así como una mayor actividad locomotora (Correa y cols., 1999, 2000) luego del consumo de la droga.

Estos resultados fueron replicados por nuestro grupo de investigación en animales periadolescentes expuestos a Pb durante el desarrollo. Específicamente, cuando la exposición transcurrió durante el desarrollo, se observó una respuesta diferencial frente a EtOH, que se evidenció como un mayor consumo de la droga (Virgolini y cols., 1999), mayor actividad locomotora luego de la última sesión de consumo de EtOH (Mattalloni y cols., 2013, 2017), y una mayor tasa de autoadministración de la droga (Mattalloni y cols., 2013). A partir de estos resultados, propusimos a las enzimas que metabolizan el EtOH como un mecanismo de acción común entre ambos tóxicos. Esta hipótesis fue abordada a través de la manipulación tanto farmacológica (Mattalloni y cols., 2013) como genética (Mattalloni y cols., 2019a) de CAT, así como de ALDH (Mattalloni y cols., 2017; Mattalloni y cols., 2019b), donde en ambos casos se promovió la acumulación de ACD cerebral, lo que se evidenció como una potenciación en el consumo de EtOH y la actividad locomotora en las ratas expuestas a Pb (revisado en Virgolini y cols, 2019).

En conjunto, todas las evidencias en roedores demuestran que la exposición temprana a Pb genera una impronta en los organismos vivos, que puede provocar una respuesta diferencial frente al EtOH en etapas posteriores de la vida. Es de interés evaluar si estos efectos se evidencian también en otros modelos animales como los invertebrados, los cuales, a pesar de su simplicidad, presentan una alta homología genética con los seres humanos.

EL NEMATODO *C. elegans* COMO ORGANISMO MODELO

Historia

Caenorhabditis elegans es un nematodo pequeño, de 1 mm de largo en su estadio adulto, que en la naturaleza habita en el suelo y coloniza hábitats ricos en microorganismos, como las plantas y frutas en descomposición alimentándose principalmente de bacterias (Félix & Braendle, 2010; Frézal & Félix, 2015). El nombre de este nematodo proviene del griego y del latín y significa “*Caeno*”-nuevo, “*rhabditis*”-forma de caña o vara, “*elegans*”-elegante, por lo que se podría traducir como “nuevo gusano con forma de vara elegante”.

Los primeros informes científicos sobre el uso de los nematodos han aparecido en la literatura hace más de 100 años (Maupas, 1900). Subsiguientes reportes datan de

1940, donde Victor Nigon de la Universidad de Lion, Francia, recolectó la cepa denominada *Bergerac* (Nigon, 1949). Algunos años más tarde, se aisló la cepa *Bristol* de una muestra de compost de Bristol, Inglaterra (Nicholas y cols., 1959). Sin embargo, no fue hasta 1974 cuando el renombrado científico Sydney Brenner obtuvo la línea N2 derivada de la cepa *Bristol*, y presentó a este organismo como un modelo animal para el estudio de aspectos moleculares de biología del desarrollo y neurobiología. Brenner lo propuso como un modelo biológico emergente, dado la simplicidad de su sistema nervioso y la facilidad con que podía ser manipulado (Brenner, 1974). Hasta ese momento, la utilización de organismos más simples como virus y bacterias ya habían permitido grandes avances en materia de genética y biología molecular. Estos microorganismos ofrecían la oportunidad de trabajar con una gran cantidad de individuos en poco tiempo. Sin embargo, a pesar que en ese momento ya existían otros modelos animales bien consolidados, como el ratón *Mus musculus* o la mosca *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* representaba el equilibrio justo entre la sencillez de su uso y fácil mantenimiento en el laboratorio, con lo complejo de su biología. Tal fue el aporte de sus investigaciones que, en 2002, los Dres. Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston fueron reconocidos con el premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus estudios sobre el proceso de apoptosis o muerte celular programada (Brenner, 2002; Sulston & Hodgkin, 1988). Más aun, por estudios relacionados a *C. elegans*, en 2006 fueron galardonados Andrew Fire y Craig Mello por el descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi) (Fire, 2007) y en 2009 Martin Chalfie por la aplicación de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescence protein*) en el estudio de la expresión génica (Chalfie, 2009). Este nematodo, además, se convirtió en el primer organismo multicelular cuyo genoma fue completamente secuenciado (Consortium The *C. elegans* Sequencing, 1998) y su conectoma descrito (White y cols., 1986).

Desde entonces, los estudios con *C. elegans* han permitido descubrimientos fundamentales en neurociencia, desarrollo, transducción de señales, muerte celular, envejecimiento e interferencia de ARN (Antoshechkin & Sternberg, 2007; Leung y cols., 2008). Interesantemente, en la actualidad es un modelo muy utilizado en pruebas de toxicidad y para evaluar los aspectos mecanísticos de las sustancias tóxicas.

Características anatómicas y fisiológicas

C. elegans presenta 5 pares de cromosomas autosómicos (I-V) y un par de cromosomas sexuales. Si el sexto par es XX da lugar a un hermafrodita, mientras que si es XO se genera un macho, que se diferencia del anterior por la morfología de su cola a partir del estadio L2. El macho tiene una bajísima frecuencia (0,1% de la población) por la no disyunción espontánea de la línea germinal de los hermafroditas o mayor frecuencia por el apareamiento con éstos (hasta 50% de la población). La autofecundación se da en las larvas hermafroditas ya que poseen tanto ovocitos como esperma, aunque no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Esto permite la generación de una progenie genéticamente idéntica, lo que confiere grandes ventajas a los desarrollos experimentales. Por otro lado, el apareamiento del macho con el hermafrodita permite el aislamiento y mantenimiento de cepas mutantes, así como la generación de mutantes entre cepas distintas (Altun & Hall, 2009). Los hermafroditas que se reproducen por autofecundación generan alrededor de 300 huevos, mientras que los hermafroditas apareados con machos pueden producir más de 1000 huevos (Strange, 2006). Las larvas recién eclosionadas tienen un largo de 0,25 mm, mientras que un adulto mide alrededor de 1 mm (ambos sexos presentan similar tamaño).

El cuerpo del gusano adulto es anatómicamente simple, con 959 células somáticas el hermafrodita y 1031 el macho. *C. elegans* es un animal eutélico en su fase adulta, es decir, tanto el número de células como su posición son constantes en la especie. El adulto tiene una estructura bilateral simétrica, con un cuerpo cilíndrico tubular típico de cualquier nematodo (Altun & Hall, 2009). Su estructura anatómica está conformada por la boca, faringe, intestino, gónadas y una cutícula de colágeno. El orificio bucal aparece en el extremo anterior de la cabeza y le permite ingerir las bacterias con las que se alimenta, el ano se ubica en la zona ventral, cerca de la región posterior. Los hermafroditas poseen dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar el esperma y un útero (ver figura 4).

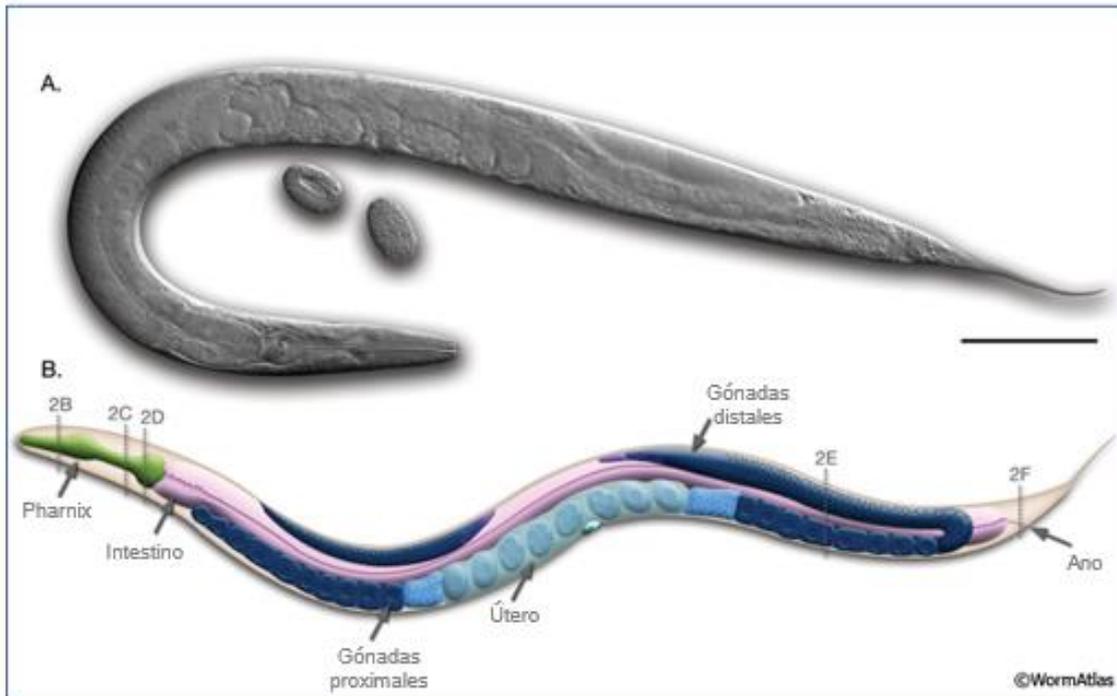


Figura 4. Anatomía de un gusano hermafrodita adulto. A. Imagen captada con microscopía con contraste de interferencia diferencial. Barra de escala: 0,1mm. B. Esquema de las estructuras anatómicas del adulto. (Imagen extraída de WormAtlas, 2020. Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Los machos tienen una sola gónada, vasos eferentes y una cola especializada para la cópula. Al tratarse de un organismo transparente durante todo su ciclo de vida, puede ser examinado a nivel celular en preparaciones *in vivo* por microscopía de contraste de interferencia diferencial (ver figura 4 A) o de disección (ver figura 5) (Corsi y cols., 2015).

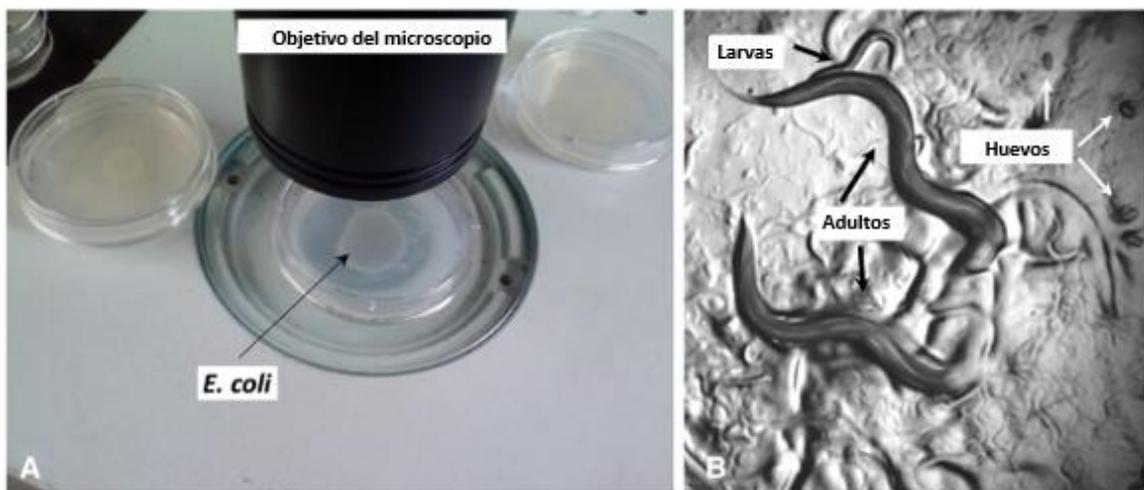


Figura 5. Vista de *C. elegans* bajo microscopio. (A) Placa de Petri situada en la base de un microscopio estereoscópico de disección. (B) Vista de *C. elegans* en diferentes estadios larvales a través de un microscopio de disección. (Imágenes extraídas de Corsi y cols., 2015)

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. elegans* está comprendido por diferentes etapas: embrionaria, larvaria (de L1 a L4) y adulto. Cada etapa consta de un proceso determinado de diferenciación celular y el final de cada estadio se consuma con un proceso de muda de su cutícula, la cual se desprende a medida que se sintetiza una nueva (Cassada & Russell, 1975).

Este organismo puede crecer en un amplio rango de temperaturas, lo que determinará la velocidad de su crecimiento. No obstante, cabe destacar que a menos de 8°C se detiene el crecimiento del nematodo, mientras que a temperaturas mayores de 25°C se tornan estériles (Félix & Braendle, 2010). Dentro del rango de 25°C el promedio de vida de *C. elegans* es de unos 10-15 días tras finalizar su etapa reproductiva adulta, que transcurre aproximadamente en unas 47hs (Wormatlas, 2020) lo que determina que en condiciones óptimas de laboratorio el promedio de vida de *C. elegans* es de 2-3 semanas. A 20°C, el ciclo de vida se completa en aproximadamente 3 días, a 25°C se eleva la tasa de crecimiento y ocurre en alrededor de 2,5 días, mientras que a 15°C, el proceso se enlentece y puede llegar a durar a transcurrir hasta en 6 días (ver figuras 6 y 7).

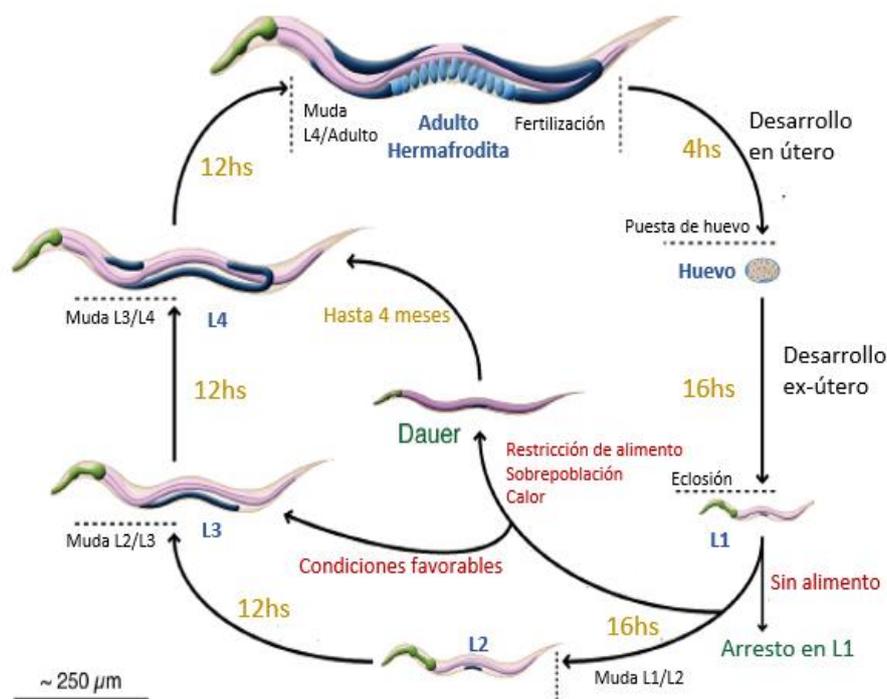


Figura 6. Ciclo de vida de *C. elegans*. Se representan las distintas fases embrionarias y larvarias por las que pasa un gusano hasta llegar a adulto a 20°C. Los números amarillos indican el tiempo que el nematodo permanece en determinado estadio antes de mudar al siguiente. (Ilustración modificada de WormAtlas, 2016)

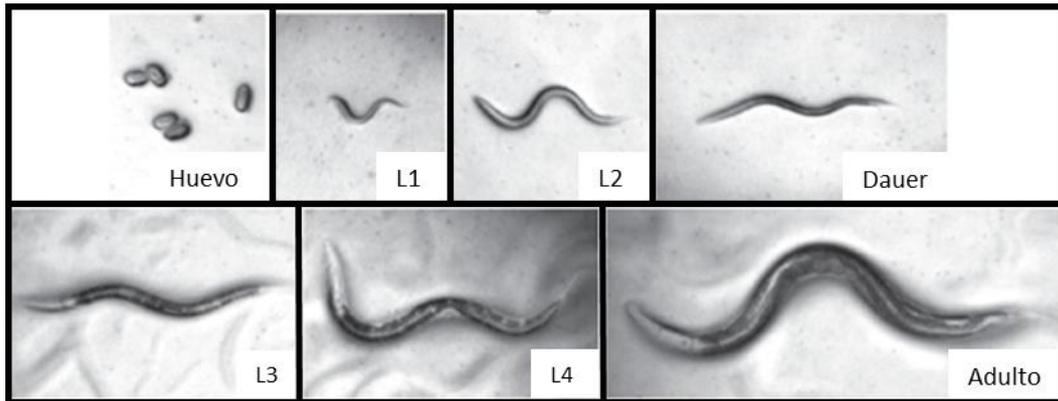


Figura 7. Imágenes representativas en contraste de fase interferencial (DIC) de todos los estadios del desarrollo del nematodo, desde huevo hasta la fase adulta. (Imágenes modificadas de WormAtlas, 2016)

Por otra parte, la temperatura puede afectar la fertilización, ya que a 20°C un adulto hermafrodita es capaz de poner unos 300 huevos en intervalos de alrededor de 20 minutos, mientras que a 25°C se producen unos 200 huevos; temperaturas mayores pueden provocar la esterilidad del nematodo (Anderson y cols., 2011; Aprison & Ruvinsky, 2014; Hosono y cols., 1982; Matsuba y cols., 2013; Petrella, 2014). Otro parámetro que condiciona el desarrollo de *C. elegans* es la disponibilidad del alimento. Si en los estadios larvales tempranos (L1-L2) se presentan condiciones ambientales desfavorables (falta de alimento o hacinamiento), este nematodo puede desarrollar un estado de resistencia llamado “dauer”. Las larvas dauer presentan un metabolismo disminuido y una mayor resistencia al estrés, no se alimentan y tienen adaptaciones estructurales, metabólicas y de comportamiento que aumentan la esperanza de vida hasta 10 veces y ayudan a la dispersión del animal a nuevos hábitats. El gusano dauer puede permanecer en este estadio hasta 4 meses (Albert & Riddle, 1988). Una vez que el alimento está disponible, las larvas dauer se alimentan y continúan su desarrollo normal hasta la etapa adulta (Smeal & Guarente, 1997; Strange, 2006).

Ventajas como modelo biológico para evaluar toxicidad

C. elegans es un nematodo que presenta numerosas ventajas para su uso en el laboratorio: la transparencia de su cuerpo, su pequeño tamaño, el bajo costo de mantenimiento, el ciclo de vida corto, la gran cantidad de progenie que produce en poco tiempo, el linaje celular simple y la facilidad de su cultivo (Riddle, Blumenthal & Meyer, 1997). Además, la fácil manipulación genética, la existencia de herramientas

bibliográficas actualizadas de libre acceso como *WormBase*, *WormBook*, *WormAtlas* y otras bases de datos, hasta la posibilidad de obtener una gran variedad de cepas a bajo costo de un repositorio internacional como lo es el *Caenorhabditis Genetics Center* (Centro Genético para *Caenorhabditis*: CGC, Universidad de Minnesota) convierten a este nematodo en una herramienta muy poderosa. A su vez, puede ser congelado y mantenido a -80°C por tiempo indeterminado, o a mediano plazo en estadio dauer, lo que garantiza la disponibilidad constante de gusanos. Todo esto ha propiciado su empleo por numerosos grupos de investigación y ha permitido la generación de conocimiento en el área de medicina, biología molecular, farmacología y toxicología.

Además de las enunciadas, la característica más importante de este organismo es que posee entre un 60% a 80 % de homología genética con el ser humano (Kaletta & Hengartner, 2006; Leung y cols., 2008). Esto adquiere relevancia puesto que la mayoría de los procesos fisiológicos básicos y de respuesta a estrés están conservados en diversas especies, ya sea nematodos, parásitos u organismos superiores, incluyendo la especie humana. En 1988, Williams y Dusenbery proponían este modelo como un buen predictor de los efectos de letalidad aguda en mamíferos, al evaluar la toxicidad aguda de ocho sales metálicas diferentes y obtener valores de LC50 (concentración que mata al 50% de la población bajo estudio) en nematodos comparables con los LD50 (dosis que mata al 50% de la población bajo estudio) de mamíferos, y a un décimo del costo de las pruebas con roedores (Williams & Dusenbery, 1988). Estas y otras evidencias demuestran que *C. elegans* tiene el potencial de predecir respuestas tóxicas que son comparables con mamíferos (Anderson y cols., 2004; Cole y cols., 2004; Hunt, 2016; Hunt y cols., 2018), pero libre de los problemas éticos que implica la experimentación con animales superiores (Casey y cols., 2015). Por otra parte, el desarrollo del ARNi en este organismo es relativamente simple, y esto ha permitido la generación de múltiples herramientas y recursos para producir mutantes bien caracterizados y bibliotecas de ARNi, de utilidad para silenciar la expresión de genes (Deuri y cols., 2018; Giles & Rankin, 2009), siendo una técnica muy utilizada para estudiar vías de señalización (Adam, 2009).

La versatilidad de este organismo también ha posibilitado que la investigación en *C. elegans* pueda llevarse a cabo midiendo tanto parámetros biológicos como efectos sobre marcadores moleculares. Los primeros contemplan letalidad, reproducción, tasa de crecimiento, locomoción, tiempo de vida, alimentación, metabolismo o puesta de

huevos. Por otro lado, los efectos sobre marcadores moleculares corresponden a componentes implicados en procesos de EO, daño al ADN, arresto del ciclo celular, apoptosis, o expresión alterada de genes y proteínas (Tejeda-Benitez & Olivero-Verbel, 2016). Además, *C. elegans* se ha utilizado para investigar el envejecimiento, dada su corta vida media, la susceptibilidad que presenta al EO y sus similitudes con el ser humano en cuanto a los procesos de envejecimiento (Chatterjee y cols., 2013; Pang & Curran, 2014). En el campo de la farmacología, es de utilidad para identificar vías bioquímicas y mecanismos de acción de fármacos en fase de ensayos preclínicos (Kumarasingha y cols., 2014).

En la investigación toxicológica, posibilitó la creación de estudios de *screening* de alto rendimiento para detectar químicos ambientales (como pesticidas, ftalatos y productos químicos utilizados en la industria del petróleo) que impactan en la salud (Shin y cols., 2019).

C. elegans se convirtió en un excelente bioindicador debido a su abundancia en los ecosistemas de suelos y a que estos organismos pueden detectar trazas de metales y exhibir diferentes fenotipos (David y cols., 2003; Mutwakil y cols., 1997; Peredney & Williams, 2000). Además, su empleo ha permitido estudiar efectos neurotóxicos de metales, en particular aquellos potencialmente peligrosos para la salud humana (Mn, Cd, Pb, Zn, cobre [Cu]), mercurio [Hg], cromo [Cr], arsénico [As], entre otros (Akinyemi y cols., 2019; Peres y cols., 2019; Xing y cols., 2009) y plaguicidas (McVey y cols., 2016; Negga y cols., 2012) dado que posee un sistema nervioso muy bien definido (ver figura 8).

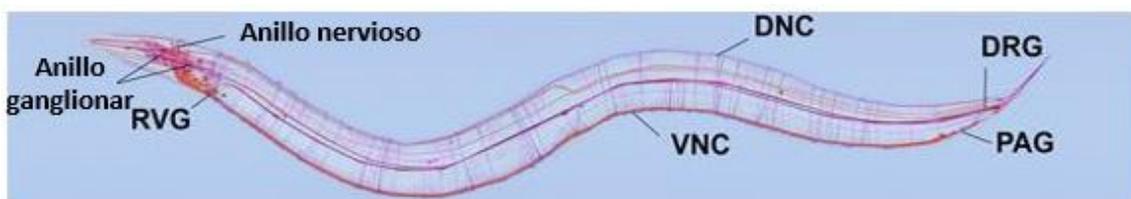


Figura 8. Anatomía del sistema nervioso de *C. elegans* hermafrodita. Diagrama de los principales ganglios y haces nerviosos en *C. elegans*. El anillo ganglionar, el ganglio retrovesicular (RVG), el preanal (PAG) y el de la raíz dorsal (DRG) constituyen los principales ganglios nerviosos, mientras que los tractos nerviosos están conformados por el cordón nervioso ventral (CNV), el cordón nervioso dorsal (CND) y el anillo nervioso. (Imagen extraída de the OpenWorm browser utility [openworm.org])

En el caso particular de estudios de exposición a pesticidas, el empleo de este organismo combinado con técnicas de ingeniería genética y GFP, permitió dilucidar patrones de estrés causados por estos compuestos usados en agricultura (glifosato, rotenona, paraquat, endosulfan) o tóxicos orgánicos persistentes (dieldrin, diclorodifeniltricloroetano [DDT]), que pueden contaminar el ambiente por largos períodos de tiempo (Anbalagan y cols., 2013).

Interesantemente, también mediante el empleo de GFP incorporada a secuencias promotoras, se logró determinar patrones de expresión de genes relacionados con diferentes mecanismos de toxicidad (Benedetto y cols., 2010; Helmcke y cols., 2009; Leung y cols., 2011) , como el choque térmico (Roh y cols., 2006) , el EO (Dues y cols., 2017; Wu y cols., 2012), el sistema de los citocromos (Anbalagan y cols., 2013) y las metalotioneínas (Polak y cols., 2014). También se han explorado otras técnicas de biología molecular, como los *microarrays* de ADN y los microARN, para evaluar los efectos de diferentes tóxicos y muestras (Menzel y cols., 2009; Roh y cols., 2009).

Por todas las características previamente mencionadas, *C. elegans* representa una herramienta muy poderosa y versátil para investigar y comprender los efectos de la toxicidad de xenobióticos sobre mecanismos biológicos que podrían trasladarse a organismos superiores. Es así que este organismo se ha convertido en el puente ideal entre los estudios *in vitro* y los que se desarrollan en vertebrados.

Respuestas a drogas de abuso en *C. elegans*

Las evidencias obtenidas hasta el momento han demostrado que este gusano es un organismo destacado para estudiar los mecanismos genéticos que sustentan los efectos de las drogas, así como los genes y sitios diana específicos para el desarrollo de medicamentos o intervenciones para esas drogas adictivas (Bettinger & Davies, 2014; Engleman y cols., 2016; Khanh, 2018). Esto se debe a que la transducción de señales en la sinapsis de *C. elegans* está mediada por neurotransmisores tales como Ach, GABA, DA, GLU, serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y varios péptidos (Rand & Nonet, 1997), todos ellos presentes en organismos superiores, incluido el ser humano.

Interesantemente, se ha demostrado que *C. elegans*, al igual que mamíferos y otros invertebrados, muestran preferencia condicionada a claves asociadas

previamente con drogas de abuso como metanfetamina (Katner y cols., 2016), cocaína (Engleman y cols., 2018; Musselman y cols., 2012), EtOH (Lee y cols., 2009), nicotina (Engleman y cols., 2018) y sustancias que afectan la neurotransmisión DAérgica, principal vía de neurotransmisión implicada en los procesos de abuso de sustancias (Engleman y cols., 2016). Más aun, *C. elegans* manifiesta dos conductas bien descritas en vertebrados y características en seres humanos luego del consumo de sustancias psicoactivas: tolerancia, definida como una adaptación que se evidencia cuando la misma dosis de una sustancia provoca una respuesta comportamental disminuida, en general luego de una exposición crónica o repetida (Bettinger & Davies, 2014; Grotewiel & Bettinger, 2015) y sensibilización (Lee y cols., 2009), es decir, la generación de una respuesta exacerbada ante una sustancia previamente administrada, o el aumento del efecto ante exposiciones repetidas de una droga.

En relación a las drogas que han sido estudiadas en *C. elegans*, se ha demostrado que nicotina afecta la contracción muscular y la puesta de huevos, produce motilidad incoordinada y tolerancia (Waggoner y cols., 2000). Más aun, Sellings y cols demostraron atracción a nicotina dependiente de la concentración, el tiempo y la edad, que se vio reducida frente a la exposición a antagonistas no selectivos de los receptores nicotínicos, como mecamilamina o vareniclina (Sellings y cols., 2013).

Por otro lado, la exposición a dosis relativamente altas de cocaína (mayores a 1 mM) provocó una reducción moderada de la locomoción, efecto que parece estar mediado por el sistema serotoninérgico (Ward y cols., 2009). Además se ha demostrado, a través de la asociación de cocaína con claves ambientales (alimento o medio salino), que esta droga genera en los nematodos comportamientos de tipo “reforzantes” (Musselman y cols., 2012).

La metanfetamina provocó una disminución en la puesta de huevos (a dosis mayores a 8 mM), en la búsqueda de alimento (a más de 2 mM) y en la locomoción (a 16 mM) (Schreiber & McIntire, 2011). Poco se sabe sobre la relación entre las propiedades neurotóxicas y apetitivas de la metanfetamina, pero este modelo puede servir para estudiar en mayor profundidad dicha relación (Engleman y cols., 2016).

En particular, se ha demostrado que este nematodo responde a la exposición de EtOH a través de una variedad de comportamientos tales como la puesta de huevos, la locomoción o la amplitud de los contorneos corporales (McIntire, 2010). A partir de

estos paradigmas, se han empleado herramientas de genética molecular para identificar mutaciones en genes individuales que pueden afectar las respuestas frente a esta droga. Una vez identificados dichos genes, los homólogos conservados en humanos o en otros modelos animales e incluso los polimorfismos de dichos genes pueden ser evaluados para interpretar su rol en desordenes del uso de sustancias (Engleman y cols., 2016). A este respecto, un análisis detallado de las evidencias existentes en relación a las respuestas a EtOH en *C. elegans* puede encontrarse en la introducción de cada objetivo de este trabajo de tesis.

En base a lo dicho y a pesar de las evidencias respecto de las drogas de abuso y los mecanismos que median los efectos descritos en *C. elegans*, es necesario tomar en consideración las limitaciones para este modelo, como por ejemplo la ausencia de algunos sistemas de neurotransmisión (como la noradrenalina) u otros menos estudiados (como los opioides). Esto determina la necesidad de seguir aportando nuevas evidencias que fortalezcan la utilidad de este organismo en estudios de toxicidad y de adicción a drogas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes presentados, se postula que la exposición a Pb en etapas tempranas del desarrollo podría modificar aspectos de la neurotransmisión DAérgica en *C. elegans*, lo cual en conjunción con alteraciones en el proceso metabólico del EtOH, condicionarían una respuesta diferencial a los efectos de esta droga.

OBJETIVOS

Objetivo general

El presente trabajo de tesis está orientado a evaluar la participación del sistema DAérgico y del proceso metabólico de EtOH en las respuestas a esta droga en *C. elegans* expuestos a Pb durante el desarrollo.

Objetivos específicos

1. Abordar el estudio de la morfología neuronal DAérgica mediante microscopía de fluorescencia en la cepa BY200 [*dat-1p::GFP (vtIs1) V*] que expresa el promotor de DAT junto a GFP.
2. Estudiar la funcionalidad del sistema DAérgico a través de la prueba de Respuesta de Enlentecimiento Basal en cepas genéticamente modificadas que presentan alguna modificación en componentes de la sinapsis DAérgica.
3. Evaluar la tolerancia funcional aguda en respuesta a EtOH y ACD y determinar la participación de la enzima ADH en este comportamiento mediante la evaluación de una cepa que presenta una mutación nula en el gen que codifica para la enzima responsable del metabolismo de EtOH a ACD en el gusano.
4. Determinar la preferencia a EtOH y/o SAL en cepas salvajes, en un ensayo de quimioatracción que implica la autoexposición a estas sustancias.

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se exponen los materiales y métodos generales, empleados a lo largo de todo este trabajo de tesis, en tanto que en cada capítulo se detalla la metodología particular para cada experimento.

Sujetos

El organismo utilizado para la realización de los experimentos fue el nematodo *C. elegans*. Las cepas utilizadas durante este trabajo se encuentran detalladas en la tabla 1. Algunas fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Minnesota, USA), en tanto que otras fueron generosamente donadas por el Dr. Michael Aschner (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) y por el Dr. Ramón Asís (CIBICI, CONICET – UNC). Todas fueron mantenidas a 20°C en incubadora (Marca AD Biomedical, modelo CAM-120) hasta el momento de su utilización.

Tabla 1. Cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
N2	<i>Wild-type</i>	Lab Dr. Asís
BY200	<i>dat-1p::GFP (vtIs1) V</i>	Lab Dr. Aschner
RB2114	<i>K12G11.3(ok2799) V</i>	CGC
RB1254	<i>C52B11.3(ok1321) X</i>	Lab Dr. Aschner
LX734	<i>dop-2(vs105) V; dop-1(vs100) dop-3(vs106) X</i>	CGC
BC11202	<i>dpy-5(e907) I; sls10158[rCesF54D8.3::GFP + pCeh361]</i>	CGC
CB1111	<i>cat-1(e1111) X</i>	Lab Dr. Aschner
UA57	<i>bals4 [dat-1p::GFP + dat-1p::CAT-2]</i>	Lab Dr. Aschner
MT15620	<i>cat-2(n4547) II</i>	Lab Dr. Aschner
MAB398	<i>dat-1p::GFP (vtIs1) V + dat-1(ok157) III</i>	Lab Dr. Aschner

Mantenimiento

Los gusanos fueron mantenidos en placas de Petri conteniendo agar *Nematode Growth Medium* (NGM) u otro medio denominado 8P, sembradas con bacteria *Escherichia Coli* (*E. coli*) OP50 como fuente de alimento (Brenner, 1974). Esta bacteria presenta la particularidad de que es auxótrofa para el uracilo, es decir que no tiene la capacidad de sintetizarlo. Su crecimiento limitado debido a la auxotrofia permite una

adecuada visualización de los nematodos bajo lupa o microscopio (MacNeil & Walhout, 2013; Reinke y cols., 2010). Los medios de cultivo utilizados para los experimentos presentan los mismos componentes, pero en distinta proporción (ver más adelante). La elección de cada uno se basó en la finalidad de la placa: NGM se utilizó para la visualización y realización de ensayos en los gusanos, ya que es un medio más claro y translúcido que 8P. Este último en tanto, se utilizó exclusivamente para el crecimiento y mantenimiento de los organismos, debido a que, al poseer más peptona en su composición, la bacteria crece en mayor medida, por lo que se obtiene un césped más grueso y durable para la alimentación de los gusanos.

Preparación de los medios de cultivo

Materiales:

- NaCl (Biopack)
- Agar bacteriológico (Britania)
- Peptona bacteriológica (Britania)
- Agua *mili Q*
- CaCl₂ 1M
- MgSO₄ 1M
- Colesterol (Sigma- Aldrich) (5mg/ml etanol)
- Nistatina Micronizada (M6305)
- Buffer fosfato 1M pH= 6 (10,44 g de K₂HPO₄ y 127,9 g de KH₂PO₄, llevar a 1 litro con agua *miliQ*)

Procedimiento:

Para preparar medio NGM, se disolvió en botella autoclavable con tapa 1,2 gr de NaCl, 6,8 gr de agar y 1 gr de peptona en 390 ml de agua *mili Q*. En el caso del medio 8P, se disolvió 1,2 gr de NaCl, 10 gr de agar, 8 gr de peptona en 390 ml de agua *miliQ*. En ambos casos se esterilizó la solución durante 55 minutos en olla a presión. Posteriormente se llevó a baño María a 55°C durante al menos 15 minutos, para permitir que descienda la temperatura del medio y no afecte los componentes con los que se los aditiva luego. Una vez que se alcanzó la temperatura ambiente, se incorporaron bajo

llama de mechero 400 μ l de CaCl_2 , MgSO_4 , colesterol y nistatina, y 10 ml de buffer fosfato 1M pH= 6. Se homogeneizó suavemente para evitar la formación de burbujas y se vertió en placas de Petri que se taparon inmediatamente para evitar su contaminación. Se dejaron reposar toda la noche hasta su solidificación y secado. A la mañana siguiente, se sembraron con bacteria o se almacenaron a 4°C según la necesidad.

Crecimiento de bacteria, inoculación y condiciones de ensayo

La bacteria se creció en medio *Luria - Bertani* (LB) a 37°C en agitación durante toda la noche. El inóculo inicial puede ser obtenido del CGC o recuperado a partir de otra placa sembrada. En este último caso es conveniente preparar un medio LB sólido y sembrar con la técnica de estriado (ver figura 9). Luego de una noche a 37°C, se seleccionó una colonia aislada de *E. coli* y se incorporó en el medio LB líquido para crecerla como se mencionó previamente.

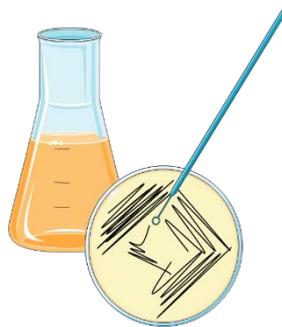


Figura 9. Placa de Petri con siembra en estriado

Preparación del medio Luria-Bertrani para el crecimiento de *E. coli* OP50:

Materiales:

- Extracto de levadura (Britania)
- Triptona (Britania)
- NaCl (Biopack)
- Agua *miliQ*
- Agar bacteriológico (en caso de preparar LB sólido) (Britania)

Procedimiento:

Se disolvieron 0,5 gr de triptona, 0,25 gr de extracto de levadura y 0,5 gr de NaCl en 50 ml de agua *miliQ* y se colocó en un erlenmeyer autoclavable. Cuando se requirió

medio sólido, se adicionaron 0,75 gr de agar. Se homogeneizó y se cubrió con tapón de algodón envuelto de gasa y papel aluminio. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos. En el caso del medio para LB sólido, se vertió inmediatamente sobre placas para realizar los estriados. Por el contrario, el medio líquido se guardó a 4°C hasta el momento del uso. Para sembrar las placas NGM, en condiciones de esterilidad se colocaron 500 ml de *E. coli OP50* ya crecida en LB líquido, se esparció la gota por el centro de la placa con un ansa de Drigalsky estéril y se llevó a 37°C como se mencionó previamente. Eventualmente el pasto de las placas en uso puede ser insuficiente para la población presente en dicha placa, por lo que en esos casos se procedió a concentrar *E. coli OP50*. Esto se hizo centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos un total del 12 ml del medio LB líquido inoculado. El pellet resultante se resuspendió en 3 ml del sobrenadante y se agregó 200 µl de este concentrado por placa.

Sincronización

Todos los ensayos se realizaron con nematodos pertenecientes al mismo estadio larval a partir de un proceso llamado “sincronización” (Stiernagle, 2006). Este consiste en realizar un tratamiento con hipoclorito de sodio (NaClO) e hidróxido de sodio (NaOH) para eliminar larvas de distintas etapas y mantener sólo los huevos, cuya cutícula más resistente los protege de la solución alcalina.

Materiales:

- Agua *miliQ* estéril
- Tubos tipo falcon estéril con tapa de 15 ml
- NaOH 5N
- NaClO 5%
- Solución M9 estéril (3 gr KH₂PO₄, 6 gr Na₂HPO₄, 5 gr NaCl, 1 ml de MgSO₄ 1M, H₂O hasta completar 1 litro. Esterilizar con autoclave)

Procedimiento:

Se partió de una placa cargada mayoritariamente con gusanos adultos y huevos, la cual se lavó con 7ml de agua *mili Q* estéril. Se trasvasó el líquido a un tubo falcon estéril de 15 ml y se agregó 2 ml de NaClO y 1 ml de NaOH hasta un volumen final de

10ml. Se agitó 10 segundos y se dejó reposar el siguiente minuto, proceso que fue repetido 5 veces. Posteriormente se centrifugó 30 segundos a 2000 rpm y se lavó el pellet con 5 a 10 ml de agua *mili Q*. Este proceso se repitió dos veces más, en tanto que el tercer y último lavado se hizo con M9 estéril. Finalmente, se sembró parte del pellet en placas 8P sembradas con *E. coli* OP50, y se llevó a 20°C hasta el momento de los ensayos, siempre controlando que la placa no se haya sobrepoblado ni agotado de alimento. En tal caso, se deben transferir los gusanos a otra placa o agregar alimento (batería *E. coli* OP50 concentrada, ver antes), según corresponda.

Transferencia de gusanos

En casos de sobrepoblación de gusanos, agotamiento de bacteria o contaminación de la placa huésped, es de utilidad transferir una parte de la población a una nueva placa con bacteria. Si bien el crecimiento de hongos y otras bacterias distintas a la que utiliza el nematodo como alimento no suelen dañarlo, pueden alterar su fisiología o dificultar su visualización bajo la lupa (Stiernagle, 2006), por lo que es recomendable su transferencia a nuevas placas por alguno de los dos métodos siguientes:

1. Se trasladan los nematodos individualmente con un ansa de platino estéril (este proceso suele llamarse comúnmente “picar” los nematodos). Se debe procurar no hacer contacto con la parte contaminada de la antigua placa.
2. Se corta o fragmenta una porción no contaminada del agar de la placa huésped y se lo posiciona boca abajo en una nueva placa sembrada en la cual los gusanos comenzarán a distribuirse.

Conservación de gusanos a largo plazo

Una ventaja que presenta este modelo es que una gran cantidad de cepas pueden ser conservadas en freezer -80°C por algunos años, o indefinidamente en nitrógeno (196°C). Para un proceso exitoso, es fundamental respetar las siguientes condiciones: obtener animales en una etapa determinada del desarrollo (larvas en estadio L1 - L2 sobreviven mejor al congelamiento), el uso de glicerol en la solución de

conservación y un enfriamiento gradual hasta -80°C . El protocolo se obtuvo de *Wormbook*, al cual se le realizaron ligeras modificaciones (Stiernagle, 2006).

Materiales:

- S-Buffer (K_2HPO_4 0,05 M; KH_2PO_4 0,05 M; NaCl)
- S-Buffer + glicerol 30% v/v (Biopack)

Procedimiento:

Para preparar S-buffer, se pesaron 0,28 gr K_2HPO_4 , 1,48 gr de KH_2PO_4 y 1,46 gr de NaCl. Se llevó a 250 ml con agua *miliQ*. A una alícuota de esta solución se le agregó glicerol (proporción 7:3) y se esterilizó todo en autoclave por 20 minutos.

Para el congelamiento de los gusanos, se sincronizó el día previo una o dos placas conteniendo abundante cantidad de huevos y se colocaron todos en una sola placa NGM sin bacteria. De este modo, los huevos eclosionaron y ante la falta de alimentos quedaron arrestados en L1. Es importante resaltar que no deben pasar más de 18 - 24 h de este proceso para que los gusanos no entren en fase dauer, en la cual muestran una menor resistencia al enfriamiento. Así, bajo condiciones de esterilidad, se lavó la placa con 6 ml de S-buffer y colectó en un tubo estéril. Se centrifugó 30 segundos a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante de manera tal de obtener un volumen conocido de pellet (aproximadamente 1 – 2 ml en función de la cantidad de larvas que se obtuvieron luego de la sincronización). Si se obtuvieron pocos gusanos se debe procurar diluir la muestra lo menos posible. A continuación, se agregó al tubo el mismo volumen de la solución de “S-buffer + glicerol”, se homogeneizó y se llenaron crioviales a razón de 1,5 ml cada uno. En un recipiente de varias capas de poliestireno se enfrió a -80°C durante 24 h. Al día siguiente, se reubicaron en cajas rotuladas y conservaron en freezer hasta su uso, momento en que se extrajo un criovial y se colocó todo su volumen en placas NGM con bacteria, las que se mantuvieron a 20°C en incubadora. Es recomendable utilizar la cepa para ensayos luego de al menos 1 o 2 ciclos posteriores a su descongelamiento, para de este modo evitar alteraciones en el comportamiento debido al estrés térmico sufrido.

Modelo Experimental

Introducción

La exposición a varios metales pesados puede afectar distintos “puntos finales” en *C. elegans*, tales como la velocidad de reproducción, el ciclo de vida, la capacidad de alimentación, el desarrollo neuronal y otros parámetros (Boyd y cols., 2003; Ruszkiewicz y cols., 2018; Yu y cols., 2016). En relación al Pb, se sabe que puede generar alteraciones en el nematodo como consecuencia de toxicidad, tanto aguda como crónica. En el primer caso se demostró que períodos cortos de exposición (menor a 12 horas), pueden generar una disminución en la locomoción (Boyd y cols., 2003; Wang & Xing, 2009), cambios en los patrones de movimiento (Wang & Xing, 2008), o una conducta de alimentación disminuida (Anderson y cols., 2001, 2004). Interesantemente, Guo y cols observaron defectos en la capacidad reproductiva (disminución en el número de puesta de huevos así como un alargamiento en los tiempos de generación de la progenie), en todos los estadios larvales del gusano cuando fueron expuestos a Pb en medio líquido durante 4 horas, siendo las larvas en desarrollo (particularmente el estadio L1) más vulnerables que los adultos jóvenes (Guo y cols., 2009). A nivel neuronal, se han reportado efectos deletéreos sobre neuronas DAérgicas, tanto en la morfología y la estructura de dichas células como también en su función, efecto que parece estar mediado por los niveles del transportador de DA (Akinyemi y cols., 2019). También se vio que la exposición a Pb durante 6 horas en gusanos L1 a L4 provoca un incremento significativo de manera dependiente de la dosis en las alteraciones morfológicas de motoneuronas GABAérgicas ventrales y dorsales, así como déficits en la neurotransmisión colinérgica, siendo las larvas jóvenes más susceptibles a los efectos tóxicos que las larvas adultas, no sólo a nivel de la neurotransmisión sino también en la letalidad causada por Pb (Xing y cols., 2009a; Xing y cols., 2009b). Otros grupos reportaron que la exposición aguda a este metal puede provocar una disminución en el desempeño del animal en pruebas de memoria (Ye y cols., 2008) o en el aprendizaje asociativo en un modelo de termotaxis (Zhang y cols., 2010). Este último efecto pudo ser prevenido por el pretratamiento con agentes antioxidantes como dimetilsulfóxido (DMSO) o N-acetilcisteína (NAC) (Wu y cols., 2012), dando la pauta de que la generación de EO estaría participando en el mecanismo de toxicidad que ejerce este metal.

Se han reportado asimismo evidencias con respecto a exposiciones más prolongadas (subcrónicas). Al respecto, Tiwari y cols informaron modificaciones no sólo en la locomoción sino también en el crecimiento cuando los nematodos fueron mantenidos en concentraciones subletales (3, 15 y 30 μM) de Pb por 24 horas. En sus estudios observaron una serie de alteraciones dependientes de la dosis en los movimientos reversos y cambios de dirección, así como también una disminución en el largo del cuerpo de los gusanos y un aumento de la velocidad peristáltica (Tiwari y cols., 2020). Otro grupo de investigación reportó una disminución en el número de contorsiones corporales (CC), los movimientos de cabeza y la frecuencia de movimientos reversos luego de la exposición a Pb, efecto que pudo ser mitigado con el pretratamiento con selenio (Se). Los cambios en los ensayos de locomoción, según este trabajo, podrían deberse a la acción que ejerce el Pb sobre neuronas sensoriales AFD, ya que se observó que luego del tratamiento con el metal, se produjo una disminución de la intensidad relativa de fluorescencia de los cuerpos celulares de estas neuronas (Li y cols., 2013). Cambios similares se observaron en motoneuronas GABAérgicas: tanto la intensidad de fluorescencia como la morfología neuronal resultó ser afectada de manera dependiente de la dosis en gusanos expuestos a Pb durante 24 horas (Du & Wang, 2009).

En cuanto a la exposición crónica (más de 24 horas), Wang y Yang demostraron que una exposición sostenida a Pb durante 3 días produce en el nematodo numerosos efectos biológicos adversos (acortamiento de la vida media, disminución del tamaño corporal, anormalidades reproductivas y defectos en la función del sistema nervioso y muscular) también de manera dosis dependiente, muchos de los cuales son transferibles a su progenie, incluso más severos que en las generaciones parentales (Wang & Yang, 2007). A su vez, Yu y cols reportaron una inhibición del crecimiento y cambios en el patrón de movimiento, que resultó ser más marcado en la generación subsiguiente a la expuesta, dato que refuerza la importancia del estadio del desarrollo en que se produce una exposición y cómo ésta puede afectar a su progenie (Yu y cols., 2013). Más aun, se ha visto que los efectos en el crecimiento, la alimentación y la reproducción permanecen hasta cuatro generaciones, pudiendo ser incluso más notorios en la cuarta generación que en la primera o segunda (Yu y cols., 2016). Por otra parte, Sun y cols reportaron una disminución en la actividad locomotora así como una menor duración de vida en gusanos expuestos durante 36 hs a 8,5 μM de nitrato de Pb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), desde el estadio

L1 hasta el adulto (Sun y cols., 2016). Monteiro y cols, por otra parte, observaron fenómenos contrapuestos: la exposición a dosis moderadas a altas de Pb por 4 días produjo efectos negativos en el movimiento y la reproducción de las larvas (Monteiro y cols., 2014). Sin embargo, cuando la concentración del metal fue muy baja (menor a 0,5 μM), se observó un efecto estimulante en la reproducción y el crecimiento, debido posiblemente a una estrategia de supervivencia o de dispersión en un ambiente estresante (Monteiro y cols., 2014; Roh y cols., 2006). Este comportamiento puede ser indicativo de *hormesis*, fenómeno que ya ha sido descrito para Pb en otros modelos animales, y que se produce cuando concentraciones más bajas y no dañinas de un tóxico provocan un efecto estimulante que actúa como una respuesta adaptativa, protegiendo al organismo contra posteriores exposiciones a dosis mayores del mismo contaminante (Wang & Xing, 2009; Zhao & Wang, 2012).

En base a lo expuesto, se desprende que hasta el momento no existen estudios que evalúen la exposición a este metal durante el desarrollo en *C. elegans*. A continuación, se detallan las diferentes estrategias implementadas a fin de establecer el protocolo de exposición a Pb más adecuado en este modelo animal.

Ensayos preliminares

Protocolo de exposición a acetato de Pb en medio sólido

Materiales:

- Placas de Petri de 10 cm de diámetro
- Agar NGM
- Acetato de Pb [$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$] (BioPack)
- Bacteria *E. coli* OP50

Procedimiento:

Se colocaron tres concentraciones diferentes de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en el agar fundido, de manera de obtener las siguientes concentraciones finales: 2,5 μM ; 5 μM y 50 μM . Posteriormente, se vertió el agar sobre las placas y se las dejó secar una noche completa para luego sembrar bacteria *E. coli*. Se llevaron dichas placas a estufa a 37° durante la noche para que la bacteria forme el pasto y al día siguiente se colocaron huevos de una

población sincronizada en cada placa de ensayo. Se registró el aspecto del agar y el comportamiento de los gusanos luego de 24 hs.

Resultados:

Tabla 2. Ensayo de exposición a $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en medio sólido.

	2,5 μM	5,0 μM	50,0 μM
Aspecto del medio	Agar de característica turbia, poco traslúcido.	Agar de color blanquecino, más opaco que la concentración de 2,5 μM .	Agar muy denso, de color blanco mate, con precipitados.
Comportamiento de los nematodos	Huevos eclosionados y gusanos vivos, en estado normal.	Huevos eclosionados, gusanos sin movimiento.	Mayoría de huevos sin eclosionar o eclosionados, pero muertos.

Protocolo de exposición a nitrato de Pb en medio sólido

En función de lo obtenido, se decidió repetir la prueba con una sal de Pb distinta, a fin de intentar disminuir la formación de precipitados. En este caso se utilizó $Pb(NO_3)_2$, que es la forma de exposición a Pb más utilizada en estudios de experimentación (Tiwari y cols., 2020). Se repitió el procedimiento mencionado previamente, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Ensayo de exposición a $Pb(NO_3)_2$ en medio sólido.

	2,5 μM	5,0 μM	50,0 μM
Aspecto del medio	Agar de característica turbia, formación de precipitados de la sal.	Agar de color blanco, difícil observación de gusanos.	Agar muy denso, de color blanco, con precipitados.
Observaciones metodológicas	La sal precipita en todos los casos cuando se incorpora al agar. No es posible observar el comportamiento de los gusanos.		

Protocolo de exposición a nitrato de Pb adicionado al pasto de bacteria E. coli OP50

Debido a que la cutícula de los nematodos ofrece una barrera semipermeable para la incorporación de diferentes compuestos (Rand & Johnson, 1995), la exposición oral se convierte en una vía de ingreso plausible para la investigación toxicológica. Por este motivo, se ensayó la vía de ingreso del metal a través del pasto de bacteria con la cual se alimentan los nematodos y se registraron los resultados obtenidos.

Materiales:

- Placas de Petri de 10 cm de diámetro
- Agar NGM
- $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (BioPack)
- Medio K (32 mM KCl / 51 mM NaCl) (2,38 gr de KCl y 2,97 gr de NaCl en 1 lt de agua)
- Bacteria *E. coli OP50*

Procedimiento:

Se preparó el medio NGM y se vertió en placas de Petri de acuerdo a las condiciones experimentales mencionadas anteriormente. Una vez que el medio se solidificó (por reposo durante una noche), se realizaron inoculaciones de una solución madre de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 200 μl de bacteria, de manera tal de obtener en 2,5 μM ; 5 μM y 50 μM de concentración final, y se sembró con ansa en las placas a 37° durante toda la noche. Así, el pasto de bacteria contiene el metal de interés. Posteriormente, se colocaron en las placas huevos provenientes de una población sincronizada, y se observó la respuesta de los huevos en las siguientes 24 y 48 hs.

Resultados:Tabla 4. Ensayo de exposición a $Pb(NO_3)_2$ en el pasto de bacteria.

	2,5 μM	5,0 μM	50,0 μM
Aspecto del pasto	Blanco translúcido.	Blanco, muy turbio.	Blanco, mate. Difícil de esparcir.
Comportamiento de los gusanos	Los gusanos eclosionaron, pero no crecieron debido a que no se acercaron al pasto de bacteria.		

Protocolo de exposición a nitrato de Pb en medio líquido

Como se mencionó previamente, la ruta oral es una estrategia adecuada para la incorporación de diferentes tóxicos. Dado que la exposición a diferentes sales de Pb en medio sólido, ya sea en el agar como en la bacteria no resultó exitosa, se testeó dicha estrategia en medio líquido, ya que el gusano en este caso está obligado a nadar y beber continuamente la toxina.

El protocolo descrito a continuación se basa en el desarrollado por Yu y cols, con ligeras modificaciones (Yu y cols., 2013). Se utilizó $Pb(NO_3)_2$ en una concentración de 24 μM . Este valor corresponde a una exposición a bajos niveles de Pb (Anderson y cols., 2001) puesto que se ha demostrado que la DL50 de toxicidad de Pb en gusanos durante 96 hs en medio líquido es de 62 ppm (Williams & Dusenbery, 1990), es decir 300 μM , más de 10 veces la concentración empleada en este ensayo. El período escogido fue el estadio L4, ya que en gusanos hermafroditas se producen los espermatozoides que se almacenarán para fertilizar los óvulos que se desarrollarán más tarde (Hill y cols., 2006), proporcionando así un período ventana en el desarrollo del nuevo organismo.

Materiales:

- Solución de $Pb(NO_3)_2$ (BioPack) 480 μM (16 mg de $Pb(NO_3)_2$ en 100 ml de medio)
- Medio K (32 mM KCl / 51 mM NaCl) (2,38 gr de KCl y 2,97 gr de NaCl en 1 lt de agua)
- Ansa de platino
- Bacteria OP50 en medio líquido
- Placa plástica de 96 pocillos estéril con tapa

Procedimiento:

Se utilizaron placas de cultivo en las cuales se colocó para el grupo Pb, 190 µl de medio K y 10 µl de solución de $Pb(NO_3)_2$, y para el grupo C, 200 µl de medio K. Adicionalmente, se generó un grupo "Pb + Bacteria", en cuyos pocillos se colocó medio K, la solución de Pb y cantidades variables de bacteria *E. coli* para evaluar el comportamiento de la población cuando tienen disponibilidad de alimento. Posteriormente, con ansa de platino se colocaron alrededor de 50 - 70 nematodos por pocillo, se tapó y llevó a incubadora a 20°C por 96 hs. Concluido ese período, se observó el desarrollo y comportamiento de los nematodos en cada pocillo.

Resultados:

Tabla 5. Ensayo de exposición a $Pb(NO_3)_2$ en el medio líquido

	C	Pb	Pb + Bacteria
Aspecto del medio	Traslucido, fue posible observar los gusanos.		Turbio, con aspecto sucio. No se visualizan correctamente los gusanos.
Comportamiento de los nematodos	Se observan larvas en estadio L1, pertenecientes a la generación 1, y gusanos adultos, pertenecientes a la generación 0. Todos vivos y en movimiento.		Los gusanos no sobrevivieron con ninguna de las cantidades de <i>E. coli</i> utilizadas.

A partir de estos resultados, todos los experimentos de esta tesis se realizaron con el ensayo de exposición a Pb en medio líquido, sin el agregado de bacteria y sólo con leves modificaciones en la placa de ensayo para permitir la exposición de un mayor número de nematodos expuestos. Así, en lugar de utilizar una placa de 96 pocillos, se utilizó una placa de 24 pocillos, en la cual el volumen total de líquido fue de 1 ml.

Protocolo de exposición a Pb definitivo

El modelo experimental usado en este trabajo de tesis (ver figura 10) comenzó con una población sincronizada de nematodos (generación 0), que creció hasta el estadio L4. En ese momento se inició el protocolo de exposición a Pb (ver procedimiento más adelante). Noventa y seis horas después, se obtuvo la generación 1, cuya falta de

alimento produjo que permanezcan en estadio L1. Al pasarlos luego a placas NGM sembradas con *E. coli OP50*, éstos crecieron hasta el estadio L4, período en el que se realizaron los diferentes ensayos descritos en este trabajo de tesis.



Figura 10. Progresión en días del modelo experimental.

Para este tratamiento se utilizaron los siguientes materiales:

- Solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 480 μM (16 mg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 100 ml de medio)
- Medio K (32 mM KCl / 51 mM NaCl) (2,38 gr de KCl y 2,97 gr de NaCl en 1 lt de agua)
- Agua *miliQ*
- Ansa de platino
- Placa plástica multicélulas de 24 pocillos estéril con tapa

Procedimiento:

Gusanos en estadio L4 fueron expuestos a 1 ml de solución de 24 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (a partir de la solución madre de 480 μM) o a medio K durante 96 horas en placas de 24 pocillos estériles con la tapa sellada (protocolo modificado de Yu y cols., 2013). En ese período, las larvas L4 crecieron a la fase adulta (generación 0) en la cual pusieron huevos que eclosionaron y crecieron sólo hasta el estadio L1 (generación 1) debido a la falta de alimento en el sitio de exposición. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, fueron lavados con agua *mili Q* estéril y transferidos a placas NGM sembradas con alimento, en la cual crecieron hasta L4, momento en que fueron utilizados para los diferentes ensayos de esta tesis (figura 11). Los gusanos de la generación 0 fueron eliminados de la placa mediante toque con ansa caliente, para evitar mezcla en la población de nematodos. De esta manera quedan conformados los grupos experimentales: expuestos a plomo (“Pb”) y controles (“C”) expuestos sólo al vehículo, es decir medio K.

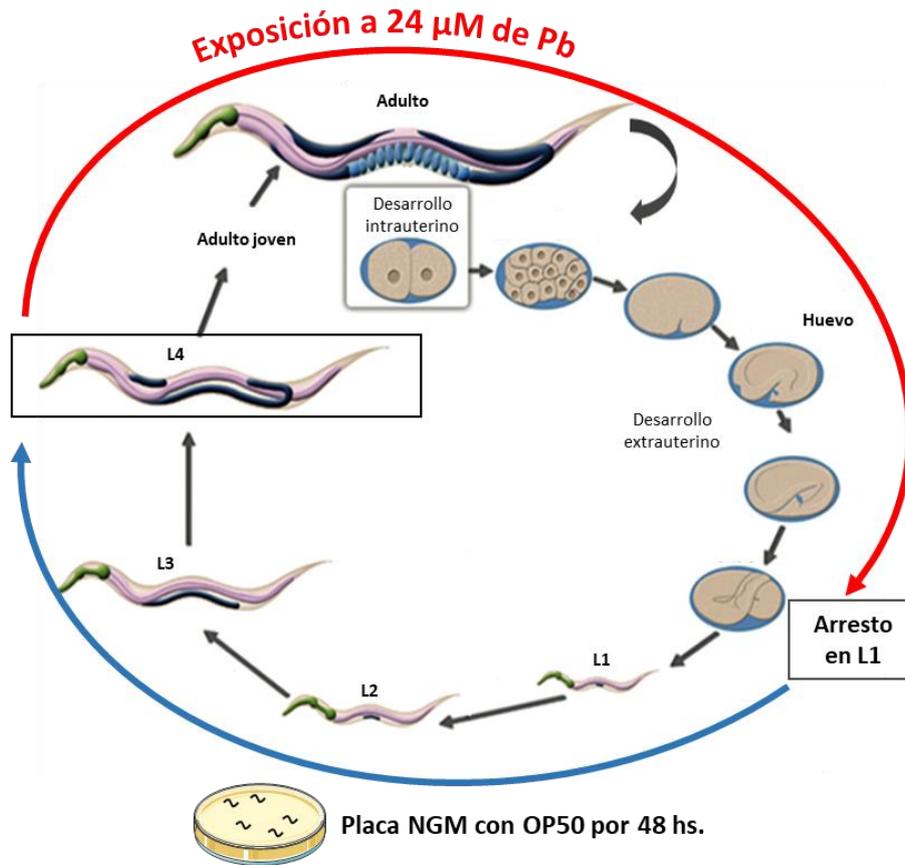


Figura 11. Esquema de exposición a Pb. Larvas en estadio L4 se colocan en un medio líquido con la solución de Pb durante 96 horas (flecha roja), tiempo en el cual crecen al estadio adulto y ponen huevos. Estos eclosionarán y quedarán arrestados en L1 debido a la falta de alimento. Posteriormente se coloca estos nematodos en placas de Petri con *E. coli* OP50 y sin Pb (flecha azul), de manera que crezcan hasta el estadio L4, momento en que se realizan los experimentos de la tesis. Los nematodos progenitores se descartan por toque con ansa caliente.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1: MORFOLOGÍA NEURONAL

Curva Concentración - Respuesta de los efectos tóxicos de Pb sobre neuronas DAérgicas

Introducción

En este experimento se determinó el nivel de afectación de la integridad de neuronas DAérgicas de *C. elegans* en función de la concentración de Pb. Se utilizó la cepa BY200 [*dat-1p::GFP (vtIs1) V*], la cual como se dijo previamente, es una cepa transgénica que expresa el promotor de DAT junto a GFP.

A pesar de su relativa simplicidad anatómica, la neuroquímica y la genética del gusano son muy similares a la de los mamíferos. La señalización nerviosa se realiza a través de los neurotransmisores clásicos como el GLU, Ach, GABA y aminas biógenas, junto con un gran número de neuropéptidos (Fang-Yen y cols., 2015).

A este respecto, en función de sus características anatómicas y la conectividad sináptica, las neuronas pueden clasificarse como sensoriales, interneuronas y motoneuronas. Las neuronas sensoriales son capaces de reconocer estímulos químicos, mecánicos, térmicos, lumínicos y son las que parecen tener terminaciones sensoriales, haya sido o no demostrado que sean funcionales. Las neuronas motoras son las que hacen sinapsis en las células musculares, mientras que las interneuronas son aquellas que realizan múltiples conexiones con otras neuronas. Esta clasificación es en cierto modo arbitraria, ya que muchas neuronas abarcan dos o más categorías (Fang-Yen y cols., 2015).

Los nematodos hermafroditas poseen un sistema nervioso compuesto por 302 neuronas, de las cuales 8 son DAérgicas. Éstas se subdividen en 2 pares denominadas cefálicas (CEP), 1 par de neuronas anteriores (ADE) y 1 par de neuronas posteriores (PDE) (Chen y cols., 2013; Sulston, Dew, & Brenner, 1975; WormBase, 2013) (ver figura 12).

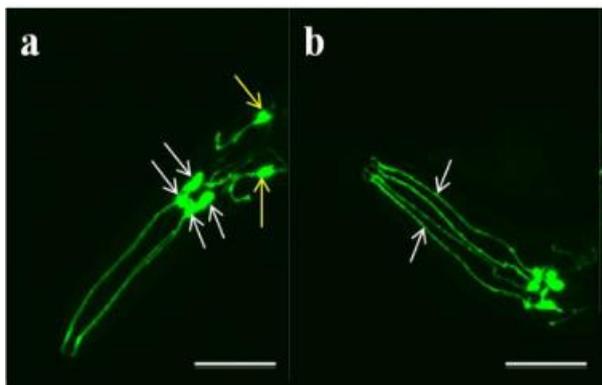


Figura 12. Imágenes representativas de la región anterior de *C. elegans* adulto. (a) denota 6 neuronas DAérgicas intactas: 4 CEP (flechas blancas) y 2 ADE (flechas amarillas). (b) denota los procesos celulares intactos (flechas blancas) de las 4 neuronas CEP. (Barra de escala: 50 μ m, magnificación 50x). (Imagen extraída de Maulik y cols., 2017)

Las neuronas DAérgicas son sensoriales debido a sus terminaciones ciliadas en la cutícula (Perkins y cols., 1986). Los procesos sensoriales de las neuronas cefálicas se extienden hasta la punta de la nariz, las terminaciones de las neuronas anteriores se sitúan de manera lateral en el tercio anterior del cuerpo, y las terminaciones de las neuronas posteriores se sitúan también lateralmente en la región posterior del cuerpo (Sawin y cols., 2000). La característica de transparencia de este organismo ha posibilitado el estudio del sistema neuronal *in vivo* a través de GFP o proteína fluorescente roja (*mCherry*). De este modo, cambios morfológicos tales como punteados, ausencia o encogimiento neuronal, vacuolización, pérdida de cuerpos celulares o interrupción de filamentos en los procesos neuronales pueden utilizarse como indicadores de signos de neurodegeneración (Chen y cols., 2013; Nass y cols., 2002).

El procedimiento más utilizado para detectar neuronas DAérgicas por microscopía de fluorescencia es mediante la observación de GFP unido al reportero de *dat-1*, un gen que codifica para DAT a nivel presináptico (Helmcke y cols., 2010; VanDuyn y cols., 2010).

Respecto a la neurotoxicidad inducida por Pb, se ha demostrado que la exposición a dosis cercanas a la DL50 produce alteraciones en el sistema DAérgico, evidenciadas como un encogimiento de somas neuronales, pérdida de la integridad dendrítica y un menor porcentaje de neuronas cefálicas intactas en gusanos transgénicos con *dat-1* adosado a GFP (Akinyemi y cols., 2019).

Materiales

- Solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 480 μM (16 mg de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en 100 ml de medio K)
- Medio K (32 mM KCl / 51 mM NaCl) (2,38 gr de KCl y 2,97 gr de NaCl en 1 l de agua)
- Agua *miliQ*
- Ansa de platino
- Placa plástica multiceldas de 24 pocillos estéril con tapa
- Portaobjeto
- Agarosa al 3% (Sigma-Aldrich)
- Cubreobjeto

- Levamisol (Sigma-Aldrich)
- Microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 801, Nikon Corporation)
- Microscopio confocal LSM510 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc) para la toma de imágenes ilustrativas

Procedimiento

Gusanos de la cepa BY200 en estadio L4 fueron expuestos a 1 ml de solución de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a concentraciones crecientes: 24, 50, 100 y 240 μM (a partir de la solución madre de 480 μM de Pb) o al medio de disolución como control vehículo durante 96 horas según el protocolo de exposición a Pb previamente descrito. Inmediatamente antes de la visualización al microscopio de los nematodos en el estadio larval adecuado, se prepararon en portaobjeto *pads* de 200 μl de agarosa al 3%; una vez secos se agregó 5 μl de levamisol, un anestésico inocuo de uso frecuente en estos organismos. Se colocaron con ansa aproximadamente 40 a 60 gusanos por *pad* y se cubrió con un cubreobjetos. Se observaron bajo microscopio de fluorescencia para determinar alteraciones morfológicas en las neuronas bajo estudio. Se estableció un puntaje de neurodegeneración en función de las alteraciones, para esto se asignaron los números de 0 a 4 de acuerdo a la siguiente escala:

- 0- célula intacta y sin cambios visibles;
- 1- leves alteraciones, es decir pequeños puntos, sin espacios ni interrupciones en los procesos neuronales;
- 2- grandes puntos en las dendritas, cambios morfológicos notorios;
- 3- punteado de mayor tamaño que en el caso anterior, de manera abundante y muy evidente (reconocidos como “burbujas”). Comienzan a evidenciarse espacios e interrupciones en las prolongaciones dendríticas;
- 4- numerosos espacios en la célula, incluso pérdida del soma o de marcación fluorescente.

Para este experimento se observaron 160 nematodos para las concentraciones de 0, 24 y 50 μM , y 68 nematodos para las concentraciones de 100 y 240 μM , a lo largo de 4 replicados. La disparidad en la cantidad total de gusanos se debe a que, como se dijo previamente, el Pb a dosis altas produce alteraciones en la capacidad reproductiva

y puesta de huevos (Wang & Yang, 2007) por lo que la progenie obtenida a 100 y 240 μM de Pb fue menor que a las concentraciones más bajas analizadas.

Resultados

En este experimento se expuso a los gusanos de la cepa BY200 con concentraciones crecientes de Pb. Como se puede observar en la figura 13, la cantidad de nematodos con algún tipo de alteración en la integridad neuronal DAérgica aumentó de manera dependiente de las concentraciones de Pb estudiadas. Así, se pudo observar que la exposición a 240 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ durante 96 horas generó modificaciones en aproximadamente el 80% de la población evaluada, valor que fue estadísticamente significativo respecto de los gusanos C, es decir que no estuvieron expuestos a Pb (ANOVA de una vía, $F [4,27] = 9,821$; p valor $< 0,001$).

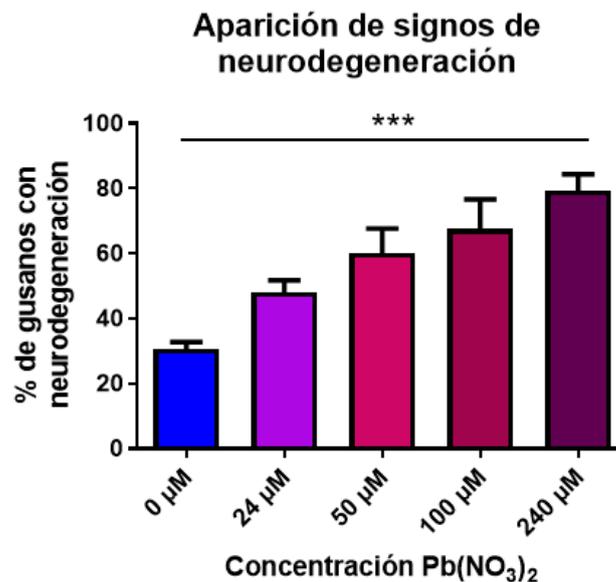


Figura 13. Efecto de la exposición a $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en gusanos de la cepa BY200, medido en función de la cantidad de organismos que presentan algún signo de neurodegeneración morfológica sobre el total observado. *** indica

A su vez, se estableció una escala en función de los cambios observados sobre los procesos dendríticos. De esta manera, se pretendió analizar la severidad de la alteración en la morfología neuronal según la concentración de Pb empleada. Como se puede observar en la figura 14 y en las fotos que la acompañan (figura 15), en el caso de los gusanos C (0 μM), alrededor de un 25% presentó daño leve, manifestado como pequeños punteados a lo largo de los procesos neuronales. Sin embargo, a medida que fue aumentando la concentración, sí se observaron modificaciones más pronunciadas.

A 240 μM de Pb se evidenció en un determinado número de gusanos, incluso la pérdida del soma de las neuronas y/o de la marcación fluorescente en sus procesos dendríticos (valor 3 y 4 en la escala de neurodegeneración). Cabe destacar que a todas las concentraciones estudiadas se observó un predominio de alteraciones leves. Esta aseveración adquiere relevancia puesto que la concentración que se empleó para realizar todos los ensayos conductuales de este trabajo de tesis fue la de 24 μM , bajo la premisa de estudiar una concentración (“subumbral”) del metal, que puede generar cambios sutiles en la integridad DAérgica, pero sin llegar a provocar la muerte neuronal. En la figura 14 y 15 correspondiente a esta concentración se pudo observar que la mayoría de los gusanos expuestos a Pb no presentaron signos de neurodegeneración, en tanto que aquellos que si lo hicieron (aproximadamente el 10% del total) estas alteraciones fueron leves.

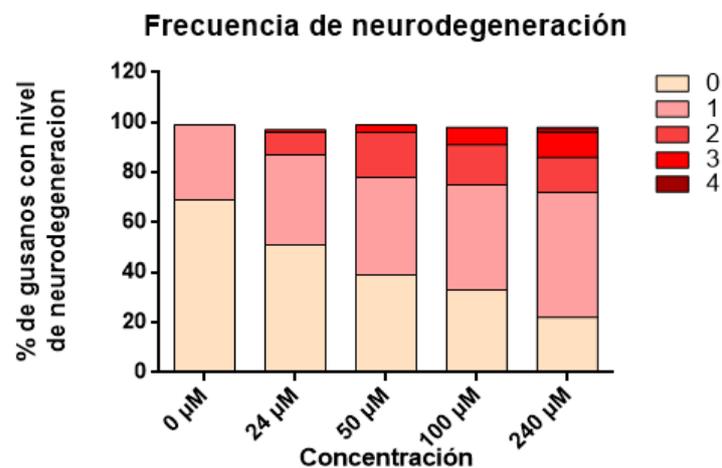


Figura 14. Nivel de daño ejercido por Pb sobre neuronas dopaminérgicas de gusanos BY200. 0- célula intacta y sin cambios visibles; 1- leves alteraciones: pequeños puntos, sin espacios ni interrupciones en los procesos neuronales; 2- grandes puntos en las dendritas, cambios morfológicos notorios; 3- punteado de mayor tamaño, abundante y evidente, con posibles interrupciones o espacios en las prolongaciones. 4- Espacios marcados en la célula, incluso pérdida del soma o de marcación fluorescente.

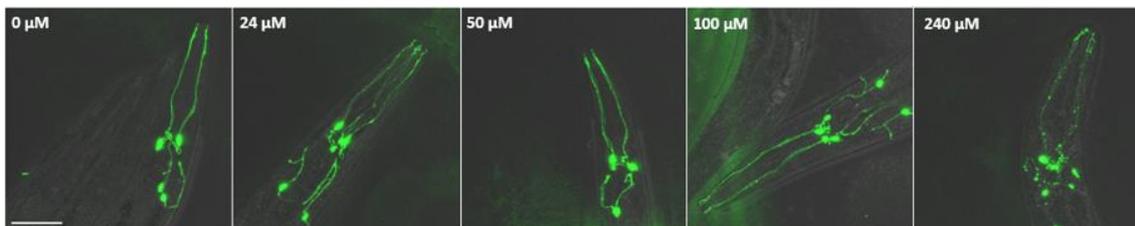


Figura 15. Fotos representativas de la morfología de neuronas CEP en gusanos expuestos a distintas concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Barra de escala: 50 μm , magnificación 50x.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran la capacidad del Pb de producir alteraciones morfológicas en neuronas DAérgicas de una manera dependiente de la concentración. A partir de estos datos, en el presente trabajo de tesis se seleccionaron los niveles de exposición que se espera provoquen mínimas alteraciones, bajo la premisa de estudiar una concentración “subumbral” del metal, que pueda generar cambios sutiles en la integridad DAérgica y que se evidencie en alteraciones neurocomportamentales, pero sin llegar a provocar la muerte neuronal.

En relación a las evidencias presentadas por otros autores, Lu y cols en 2018 reportaron que 60 μM de PbCl_2 administrados a cepas en estadio L4 generó daño a las neuronas DAérgicas en el 40% de la población, presentando un fenotipo anormal que incluía alteración en los procesos neuronales, evidenciados como una reducción de los cuerpos celulares. A este respecto cabe destacar que en nuestro estudio la dosis de 50 μM , que es la que más se asemeja a la reportada en este estudio, provocó que aproximadamente el 60% de la población evidencie algún tipo de alteración, aunque con un marcado predominio de daños leves en la morfología neuronal tal como se observa en la figura 14. Sin embargo, la gran diferencia con este estudio subyace en el periodo de exposición a Pb, que en nuestro caso se produjo en etapas tempranas de la vida del nematodo lo que, se ha demostrado en animales superiores y seres humanos, provocaría una huella en el neurodesarrollo del organismo, condicionando respuestas diferenciales para el caso que la exposición transcurra en la edad adulta (Silbergeld, 1992; Virgolini & Aschner, 2021). En base a esta aserción, resulta de interés comparar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con estudios en los que la exposición a Pb transcurra en etapas tempranas del desarrollo.

Es así que en un reporte reciente se demostró que el tratamiento agudo con 5 mM de acetato de Pb a gusanos en estadio L1 provocó que casi el 80% de las neuronas DAérgicas muestren signos de neurodegeneración, lo cual fue acompañado de una reducción en los niveles de DA (Akinyemi y cols., 2019). A este respecto, surgen algunas diferencias que dificultan la interpretación de estos resultados, algunas de las cuales se detallan a continuación. En particular, en el trabajo de Akinyemi y cols., se emplearon mayores concentraciones del metal (0-50 mM de acetato de Pb) mediante una

exposición aguda y restringida al periodo postnatal temprano (estadio larval L1). Más aun, en ese trabajo no se brindó una escala indicando el grado de neurodegeneración, ya que fue cuantificado por un sistema binario de presencia/ausencia de algunos de los indicadores de neurodegeneración mencionados anteriormente. Estas diferencias metodológicas impiden una comparación directa con nuestros datos, pero brindan evidencias sobre los efectos deletéreos del Pb sobre la sinapsis DAérgica. Particularmente, sobre la morfología neuronal que sin lugar a dudas impactará sobre la respuesta de este sistema a sustancias toxicas que han sido descritas afectan la funcionalidad de DA, evidenciándose como alteraciones comportamentales y neuroquímicas.

Por último, resulta de interés mencionar las investigaciones recientes de Ke y cols, donde se atribuye la presencia de vesículas asociadas al proceso dendrítico en neuronas CEP a una manifestación dependiente de la edad (Ke y cols., 2020). Específicamente, en este estudio se demuestra que gusanos adultos en estado basal presentan un determinado porcentaje de vesículas como consecuencia de la formación de agregados, lo cual puede ser atribuido al proceso de proteostasis o al desprendimiento de fragmentos de membrana plasmática del soma neuronal (Melentijevic y cols., 2017), fenómeno ausente en gusanos L3 jóvenes. Por lo tanto, no puede descartarse la posibilidad de que los indicadores de neurodegeneración obtenidos por nosotros en los gusanos expuestos al vehículo, aunque leves (30% de alteraciones de grado 1, ver figura 14), puedan responder a un efecto dependiente de la edad, más que a un proceso neurodegenerativo *per se*. Estudios posteriores a este respecto permitirían aportar nuevas evidencias a fin de clarificar este y otros aspectos de la morfología neuronal DAérgica en gusanos adultos y facilitar la comprensión de los daños producidos a este nivel por diversas sustancias tóxicas.

En conjunto, estos resultados sugieren que cambios leves en la morfología neuronal DAérgica podrían ser suficientes para producir manifestaciones en comportamientos que dependen de la integridad de la funcionalidad de este sistema. Es así que alteraciones, aun sutiles, en la integridad de dicha sinapsis podrían condicionar respuestas diferenciadas a otros neurotóxicos como es el caso del EtOH que, como se describió anteriormente, es una droga de abuso que comparte mecanismos neurobiológicos con otras sustancias, favoreciendo la liberación de DA en las terminales

nerviosas. En base a estos antecedentes, en el próximo capítulo se abordará el estudio en animales jóvenes de los efectos del EtOH que se ha descrito son modulados por el sistema DAérgico, a fin de establecer el impacto de la exposición temprana a este metal sobre respuestas a otros neurotóxicos en etapas posteriores de la vida.

CAPÍTULO 2: RESPUESTA DE ENLENTECIMIENTO BASAL

Respuesta de Enlentecimiento Basal en cepas salvajes y mutantes frente a la exposición a EtOH

Introducción

Una característica importante del sistema nervioso de todo ser vivo es la capacidad de responder de manera flexible a cambios en el ambiente que lo rodea. A medida que los animales exploran su entorno, sus sistemas nerviosos transitan entre una amplia gama de estados internos que influyen en cómo se procesa la información sensorial para generar una determinada conducta (Anderson & Adolphs, 2014). Estos estados internos de estimulación y motivación suelen alterar muchos comportamientos, impactando en los circuitos motores que controlan diversas manifestaciones conductuales como la alimentación y la locomoción (Cermak y cols., 2020).

Los animales pueden generar distintos patrones motores que son modificados en función de las necesidades internas del organismo y de las claves ambientales que son controlados por circuitos neuronales que actúan sobre grupos musculares específicos. La presencia o ausencia de alimento es uno de los factores más determinantes en el comportamiento de todo organismo y genera una plasticidad en el comportamiento que suele involucrar cambios en las propiedades de neuronas y sinapsis. Al respecto, se ha demostrado que la vía DAérgica está implicada en estos fenómenos, tanto en vertebrados como en invertebrados.

Se ha mencionado anteriormente que la DA, un mensajero molecular en el cerebro de organismos superiores está también presente en *C. elegans*, regulando comportamientos tales como la inhibición de la puesta de huevos (Schafer & Kenyon, 1995), la modulación de la velocidad de locomoción en respuesta a la comida (Sawin y cols., 2000) y la transición de la conducta de nado (“swimming”) a arrastre en medio sólido (“crawling”) (Abdelhack, 2016). A su vez, este neurotransmisor participa en la plasticidad del comportamiento en *C. elegans*, concretamente en una forma de aprendizaje y memoria no asociativa llamada “habitación al golpeteo” (Rankin & Broster, 1992; Sanyal y cols., 2004), así como también en los patrones de movimiento y locomoción en función de la disponibilidad de alimento (Calhoun y cols., 2015).

La adaptación del circuito mecanosensorial durante la locomoción es un mecanismo muy útil que permite a los organismos sobrevivir en diferentes condiciones

ambientales (Abdelhack, 2016). Cuando los gusanos ingresan a un césped de comida (bacteria), la DA es responsable de mediar una serie de comportamientos bien caracterizados que facilitan la ingestión del alimento, llamadas “Respuesta de Enlentecimiento Basal” (*Basal Slowing Response*, por sus siglas en inglés, BSR) (Sawin y cols., 2000) y “Búsqueda de Área Restringida” (Hills y cols., 2004).

Como se mencionó previamente, *C. elegans* posee 8 neuronas DAérgicas: 4 cefálicas (CEP), 2 anteriores (ADE) y 2 posteriores (PDE). Desde el punto de vista ultraestructural todas poseen terminaciones ciliadas en la cutícula, por lo que se les atribuye funciones mecanosensoriales (Perkins y cols., 1986; White y cols., 1986). A su vez, los receptores DAérgicos descritos en este organismo se dividen en dos grupos: D1R y D2R, en función de su homología y perfiles farmacológicos. Hasta el momento, se ha reportado que el primer grupo se conforma por los receptores DOP-1 y DOP-4, mientras que en el segundo se incluye a los receptores DOP-2 y DOP-3. Los D1R son de localización post sináptica y actúan a través de proteína $G\alpha_q$ promoviendo la generación de AMPc y ejerciendo un efecto estimulador sobre la locomoción, mientras que los D2R se localizan de manera pre y postsináptica, y actúan a través de la proteína $G\alpha_o$ para provocar una disminución en la producción de AMPc e inhibir la locomoción (ver figura 16) (Allen y cols., 2011; Chase y cols., 2004; Pandey & Harbinder, 2012).

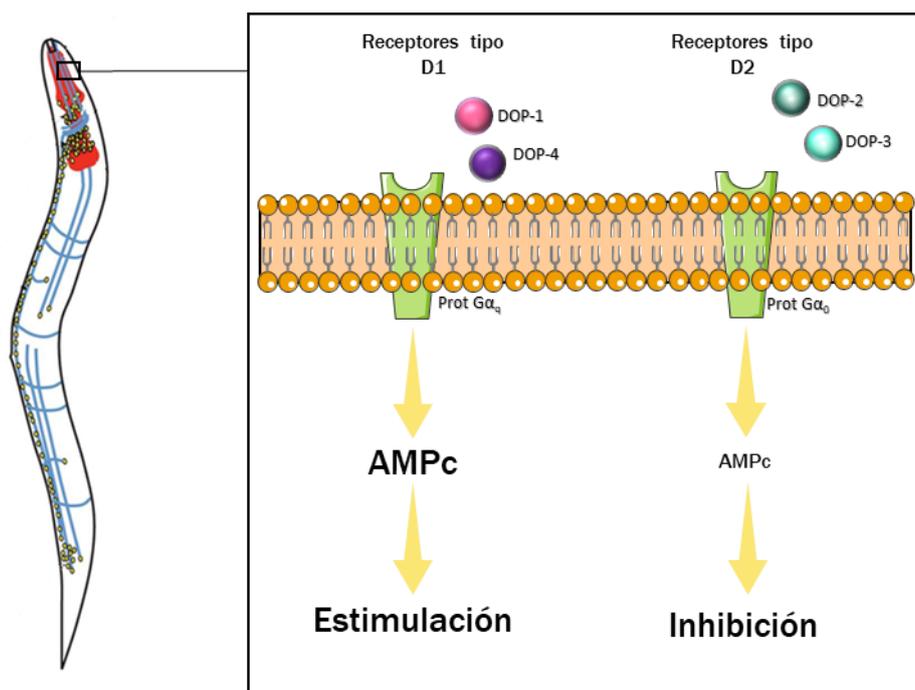


Figura 16. Mecanismo de acción de receptores DAérgicos tipo D1 y D2.

DOP-1 se expresa en células de soporte y neuronas de la cabeza, en cordón ventral (CV) y cola, así como DOP-3, que también se expresa en neuronas de la cabeza, CV, cola y de forma débil y variable en células de la pared muscular. Aun así, DOP-3 y DOP-1 muestran un solapamiento funcional puesto que se coexpresan en las mismas células pero son antagonistas entre sí (Chase y cols., 2004).

Además de las conexiones DAérgicas, el cordón nervioso ventral (CNV), la principal estructura que maneja el movimiento del gusano, contiene dos tipos de motoneuronas que inervan la pared muscular: colinérgicas, que estimulan la contracción del cuerpo, y GABAérgicas, que inhiben dicha contracción o median la relajación de músculos opuestos. En las primeras se encuentra una alta expresión de receptores DOP-1 y en menor medida DOP-3, mientras que en las segundas sólo se expresa DOP-3. Si bien DOP-3 se expresa más en neuronas GABAérgicas que colinérgicas, su función la ejerce principalmente a través de las colinérgicas, donde antagoniza la acción de los receptores estimulatorios DOP-1 (Chase y cols., 2004) (ver figura 17). Cabe destacar que, además y al igual que en animales superiores, DOP-2 actúa como un autorreceptor en *C. elegans* ejerciendo un efecto regulatorio sobre la liberación de DA (Suo y cols., 2004).

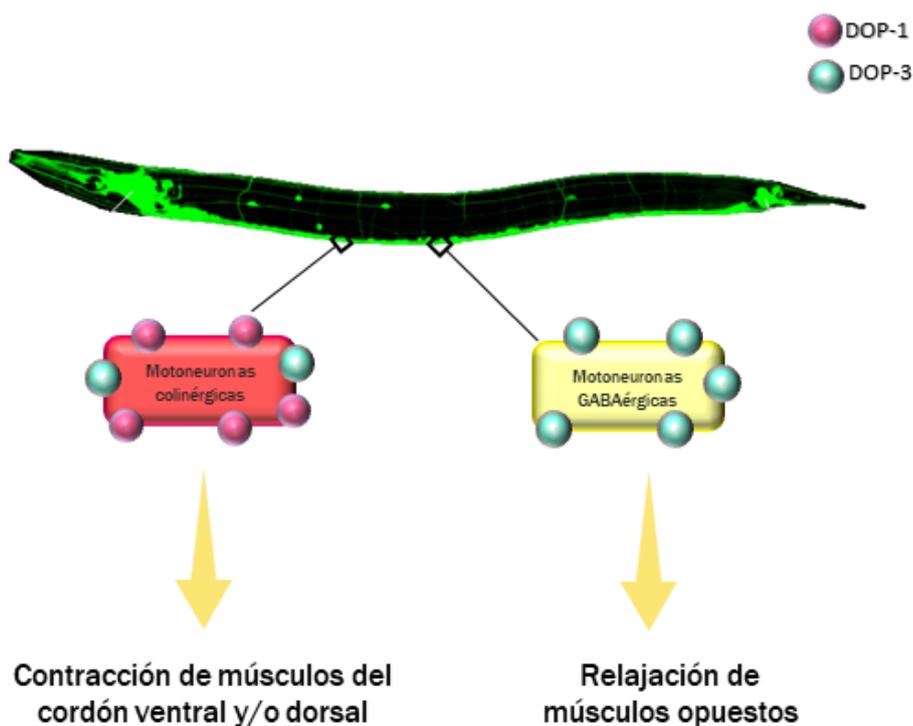


Figura 17. Expresión de receptores DOP-1 y DOP-3 en motoneuronas del cordón ventral y dorsal de *C. elegans*.

Los receptores DOP-4 se expresan en neuronas faríngeas I1 e I2, neuronas ASG, AVL, CAN y PQR, en vulva, intestino, glándulas rectales y células epiteliales rectales. También lo hacen en algunas neuronas de la cabeza, pero con un patrón más débil y variable. Este perfil de expresión sugiere que dicho receptor podría jugar un rol en la regulación de la conducta de bombeo faríngeo, la quimiosensación, la defecación, la detección de oxígeno y la conducta de apareamiento de los machos (Sugiura y cols., 2005). Por otra parte, ensayos de unión con ligandos fluorescentes demostraron que DOP-4 tiene una alta homología con los receptores de octopamina en *C. elegans* y receptores α -adrenérgicos en humanos, y un menor porcentaje de identidad de secuencia con los D1R de mamíferos. A pesar de esto, y debido a similitudes en su función con DOP-1, se considera a DOP-4 como un receptor DAérgico de tipo D1 único en invertebrados (Sugiura y cols., 2005).

El hecho de que las neuronas DAérgicas sean mecanosensoriales, le confiere a *C. elegans* la capacidad de sentir el entorno y mantenerse en la proximidad de la fuente de alimento una vez alcanzada. Esto es posible por la presencia de un receptor de estiramiento TRP-4, la subunidad formadora de poros de los canales de mecanotransducción, que se expresa tanto en las neuronas DAérgicas como también en las interneuronas DVA y DVC (Kang y cols., 2010; Li y cols., 2006). El TRP-4 es requerido en las neuronas DAérgicas para ejecutar las conductas de ralentización de la comida (Kindt y cols., 2007) y en las DVA para el control de la amplitud de la flexión corporal (Li y cols., 2006; Schafer, 2015).

En base a estas consideraciones puede definirse como BSR, a la desaceleración que se produce en los gusanos ante la presencia de comida, en las cuales neuronas mecanosensoriales CEP, ADE y PDE se activan en presencia de bacteria, liberando DA (Sawin y cols., 2000). Este neurotransmisor, a su vez, activa de manera directa o indirecta (a través de interneuronas) a motoneuronas colinérgicas y GABAérgicas del CV del gusano que son quienes regulan la locomoción y la disminuyen (Rodríguez-Ramos y cols., 2017). Cuando existe una alteración en esta vía neuronal, por ejemplo en el caso de mutantes para el canal TRP-4 (Li y cols., 2006) o en organismos deficientes en DA (Sawin y cols., 2000), los nematodos tienden a mantener una mayor actividad locomotora en presencia de comida, lo que se traduce en un menor BSR.

Sin embargo, la DA no es el único efector que media respuestas motoras asociadas con la locomoción y la presencia de alimento, puesto que otras aminas como tiramina y octopamina también influyen conductas asociadas a este estímulo (Chase, 2007; Suo y cols., 2009). De las 959 células somáticas en *C. elegans*, 302 son neuronas identificables por su linaje, localización, morfología y neuroquímica en cada hermafrodita adulto. De ellas, 75 motoneuronas inervan los músculos de la pared corporal que proporcionan el empuje durante la locomoción (Gjorgjieva y cols., 2014). Una de estas vías se encuentra detallada por Suo y cols. Específicamente neuronas glutamatérgicas ASK sensan el estímulo del alimento, y proyectan hacia neuronas DAérgicas CEP, las cuales liberan DA que actuarían sobre D2R de neuronas RIC (octopaminérgicas), inhibiendo la liberación de octopamina, que es el neurotransmisor que participa en la respuesta locomotora en ausencia de alimento. Es decir que en presencia de alimento, el control es ejercido por DA, suprimiendo la señalización de octopamina a través de D2R en neuronas RIC y SIA (colinérgicas) (ver figura 18) (Suo y cols., 2009).

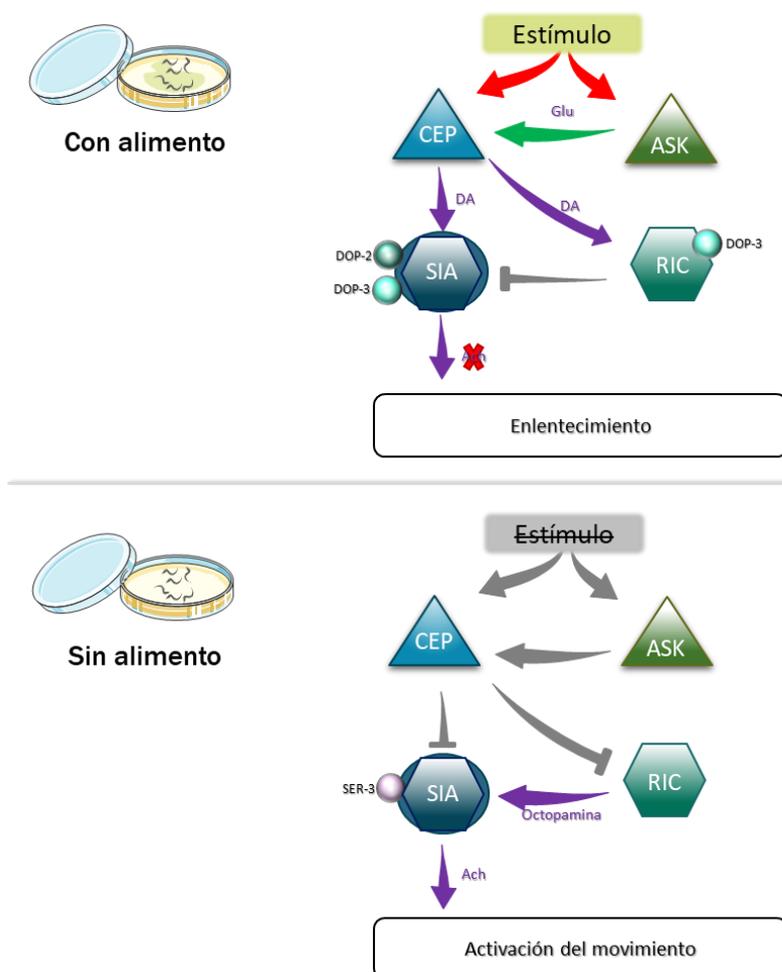


Figura 18. Regulación DAérgica y octopaminérgica de la locomoción inducida por alimento. (A) Cuando hay alimento, el estímulo es reconocido por neuronas ASK y CEP que provocan la liberación de DA, quien inhibe la de octopamina desde neuronas RIC y actúa sobre receptores DAérgicos de neuronas SIA, inhibiendo la liberación de Ach y por consiguiente provocando el enlentecimiento. (B) Sin alimento, no se produce la liberación de DA capaz de inhibir neuronas RIC, por lo que se libera octopamina desde estas células que actúa sobre neuronas SIA y liberan Ach, con la consiguiente activación del movimiento.

En cuanto a 5-HT, se ha reportado que participa en conductas tales como la puesta de huevos a través de su acción sobre comandos y motoneuronas, la conducta de alimentación por bombeo faríngeo a través de motoneuronas y músculos, y también la conducta de nado (Weinshenker y cols., 1995). Más aun, se ha reportado que cambios en la locomoción relacionados con la edad pueden ser correlacionados con cambios en el balance DA/5-HT en gusanos envejecidos (Murakami y cols., 2008).

Como se expresó previamente, la mecanosensación induce la desaceleración mediada por DA en presencia de alimento (bacteria), y puede realizarse contabilizando el número de flexiones del cuerpo del gusano en un intervalo de 20 segundos (Sawin y cols., 2000). Las tasas locomotoras se comparan entre los gusanos bien alimentados que han sido colocados en las placas con alimento en relación a los que se colocaron en las placas sin alimento y la relación se conoce como el cambio (delta, Δ) en las curvas registradas en el cuerpo del gusano durante un período de tiempo establecido. Un valor de Δ más bajo representa un menor enlentecimiento en presencia del alimento y, por lo tanto, déficits en la función DAérgica, ya que los gusanos deficientes en DA no muestran disminución en la actividad locomotora en presencia de alimento. La conducta evidenciada por la cepa *cat-2* se considera como “control positivo”, puesto que al presentar deficiencia en la enzima TH muestra un comportamiento defectuoso en la mecanosensación (Sawin y cols., 2000). Los controles apropiados para el ensayo incluyen nematodos bien alimentados y mantener la consistencia en el tamaño y grosor del césped bacteriano en todas las placas utilizadas. Se ha señalado que los gusanos mutantes nulos para *bas-1* (gen que codifica para L-dopa descarboxilasa) y *cat-4* (gen que codifica para la proteína GTP-ciclohidrolasa 1) tampoco disminuyen la velocidad en respuesta al césped bacteriano puesto que ambos están implicados en las vías de neurotransmisión serotoninérgica y DAérgica (Sawin y cols., 2000). Sin embargo, la aplicación de 5-HT exógena puede rescatar el comportamiento de estos mutantes. Por todo esto, la clave para diferenciar los efectos de 5-HT de los efectos de DA en este ensayo, es el estado de alimentación de los gusanos: la manifestación serotoninérgica de esta tarea requiere gusanos hambrientos, mientras que la DAérgica requiere que los gusanos estén bien alimentados hasta el momento del experimento.

Así, en este trabajo de tesis, se analizó el impacto de la exposición a Pb sobre el comportamiento de BSR tanto en la cepa salvaje como en cepas mutantes que presentan alguna modificación en la sinapsis DAérgica, a saber (ver figura 19):

- **UA57:** *bals4 [dat-1p::GFP + dat-1p::CAT-2]*. Las neuronas DAérgicas se encuentran marcadas con GFP y presentan sobreexpresión de TH.
- **MT15620:** *cat-2(n4547) II*. Mutante nula para TH.
- **RB1254:** *C52B11.3(ok1321) X*. Mutante nula para el receptor postsináptico DOP-4
- **LX734:** *dop-2(vs105) V; dop-1(vs100) dop-3(vs106) X*. Mutante nula para los receptores DOP-1, DOP-2 y DOP-3.
- **CB1111:** *cat-1(e1111) X*. Mutante nula para el transportador vesicular de monoaminas (VMAT)
- **MAB398:** *dat-1p::GFP (vtIs1) V + (ok157) III*. Las neuronas DAérgicas se encuentran marcadas con GFP y con mutación nula para DAT.

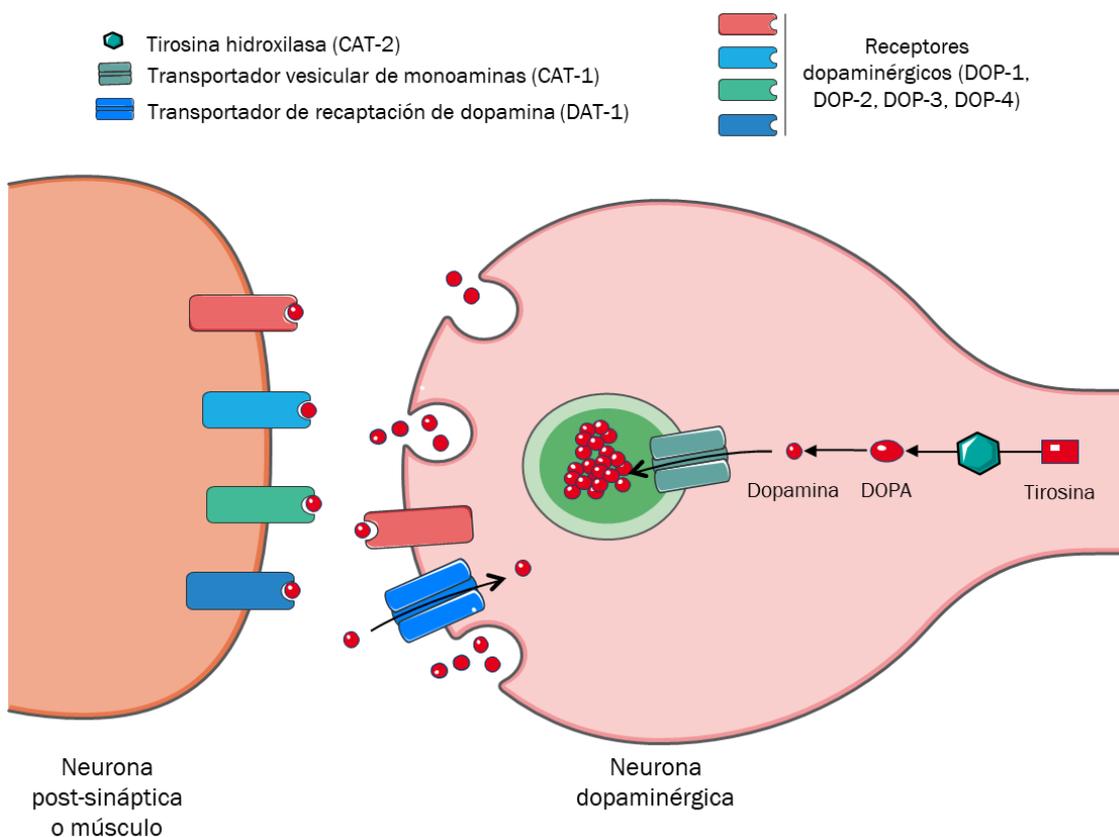


Figura 19. Esquema simplificado de la sinapsis DAérgica y todos los blancos moleculares plausibles de ser modificados con técnicas de ingeniería genética (Ilustración modificada de: Benedetto y cols., 2010).

Materiales

- Placas plásticas estériles de 6 cm de diámetro con tapa
- Medio NGM
- Bacteria *E. coli* OP50
- Lupa (Motic, modelo SMZ-171)
- Ansa de platino
- Buffer S- basal (0,28 gr K_2HPO_4 , 1,48 gr de KH_2PO_4 y 1,46 gr de NaCl en 250 ml con agua *miliQ* y posterior esterilización 20 minutos en autoclave)
- Papel absorbente

Procedimiento

Este ensayo se realizó según el protocolo de Chakraborty y cols. (2015) con ligeras modificaciones. Se utilizaron dos placas con medio NGM por grupo: una con 5 μ l de bacteria *E. coli* OP50 sembrada en forma de anillo y crecida durante toda la noche a 37°C y una placa sin sembrar (ver figura 20).

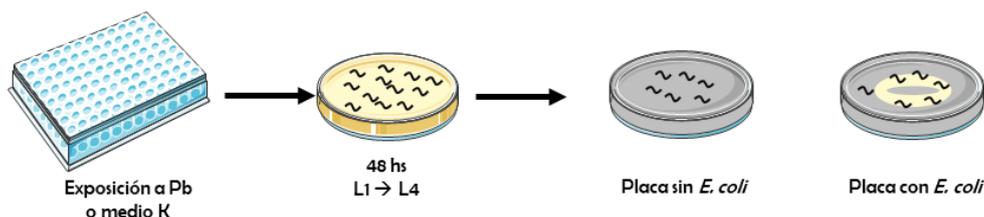


Figura 20. Esquema de protocolo empleado para evaluar la Respuesta de Enlentecimiento Basal.

Es importante tener en cuenta que la placa con alimento debe ser sembrada el día anterior, para que de este modo la bacteria sea fresca y no interfiera en el comportamiento de los nematodos. El día de la prueba se lavaron las placas C y Pb que contenían gusanos en estadio L4 con 1,5 ml de buffer S-basal. Se colectó en tubos eppendorf y se centrifugó por 15 segundos. Se repitió este paso dos veces más a fin de eliminar todo resto de bacteria que pudiera ser arrastrada desde la placa anterior. Con la punta de un *tip* cortado, se colocaron en el centro de cada placa 5 μ l del pellet, de manera tal de asegurar el traspaso de más de 20 gusanos por placa. El excedente de líquido se secó con un papel absorbente enrollado en forma de tira, y se dejaron reposar las placas de manera intacta. Al cabo de 5 minutos, se contó en cada condición el número de CC en 20 segundos de entre 6 a 10 gusanos. El criterio para considerar una contorsión fue el cambio en la dirección del *pharnix* (la cabeza), en un ángulo mayor a

45º, siempre con desplazamiento hacia adelante, es decir un cambio en la dirección de una parte del gusano con respecto al bulbo posterior de la faringe a lo largo del eje “Y”, suponiendo que el gusano se moviera a lo largo del eje “X” (Pierce-Shimomura y cols., 1999; Tiwari y cols., 2020). En caso de un desplazamiento hacia atrás, se contó como contorsión el cambio en dos veces la dirección del *pharnix*.

Cabe destacar que en este experimento también se evaluaron los efectos del EtOH (concentración final de EtOH en la placa: 200 mM) en cada condición, es decir con y sin alimento. El protocolo se siguió de manera idéntica, con la única variante del agregado de 69,12 µl de EtOH por cada 6 ml de agar en la placa, 2 horas previas a la realización del test. Esto da como resultado una concentración de 200 mM de EtOH en placa.

Análisis estadístico

Se compararon las variables grupo (C vs Pb), alimento (presencia vs ausencia) y droga (EtOH vs No EtOH) mediante un ANOVA de tres vías (gráficos no mostrados). Sin embargo, para facilitar la visualización e interpretación de los resultados, se decidió analizar los mismos mediante un ANOVA de dos vías, contrastando por separado las variables grupo y alimento, siendo la variable droga presentada en dos gráficos separados. Finalmente, se graficó y analizó la diferencia (Δ) de las CC en las condiciones de presencia y ausencia de alimento. En los gráficos sólo se denota la significancia obtenida por el test de Tukey como prueba post hoc cuando el ANOVA arrojó interacciones significativas. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico *Statistica 10* y graficados con el programa *GraphPad Prism 8*.

Resultados

Cepa salvaje (N2)

Como se observa en la figura 21, el ensayo de BSR fue realizado bajo dos condiciones experimentales diferentes: en ausencia y en presencia de EtOH. En el primer caso (figura 21 A), se pudo observar que, de acuerdo a lo esperado, tanto los nematodos C como los expuestos a Pb disminuyeron la tasa de movimiento al encontrarse en un medio con alimento respecto de la que presentaron en ausencia del mismo, no evidenciándose diferencias entre ambos grupos. Esta afirmación se basa en los datos estadísticos, los cuales mediante un ANOVA de 2 vías demuestran una diferencia significativa sólo en la variable alimento ($F [1,23] = 61,92$; p valor $< 0,001$). Por otra parte, en la condición con EtOH (figura 21 B), se observó un comportamiento similar (efecto en la variable alimento ($F [1,27] = 103,99$; p valor $< 0,001$), con una tendencia a un menor movimiento en los animales de ambos grupos. En el análisis ANOVA de 3 vías (alimento x grupo x droga), se evidencian diferencias en las variables alimento ($F [1,51] = 160,41$; p valor $< 0,001$) y droga ($F [1,51] = 11,19$; p valor $< 0,01$), sin interacciones significativas entre ellas. En la figura 22 se presentan los datos correspondientes a la **diferencia** entre el movimiento en la condición sin alimento y la condición con alimento. Del análisis de estos datos mediante el ANOVA de dos vías emergió un efecto significativo en la variable grupo (C vs. Pb) en la condición no EtOH ($F [1,23] = 10,68$; p valor $< 0,01$), así como una interacción grupo x droga ($F [1,23] = 6,02$; p valor $< 0,05$). El análisis post hoc indicó una menor diferencia en los movimientos del grupo Pb en relación a los animales C (p valor $< 0,01$) en un medio que carece de EtOH. Asimismo, y en presencia de EtOH, el grupo C evidenció una reducción significativa en sus movimientos respecto a las condiciones en ausencia de la droga (p valor $< 0,05$), efecto que no se evidenció en el grupo expuesto a Pb. Estos resultados indican un deterioro en el desempeño en esta prueba en condiciones basales (sin EtOH) en el grupo Pb, efecto que también se evidenció en el grupo C, pero sólo en respuesta a la exposición a EtOH.

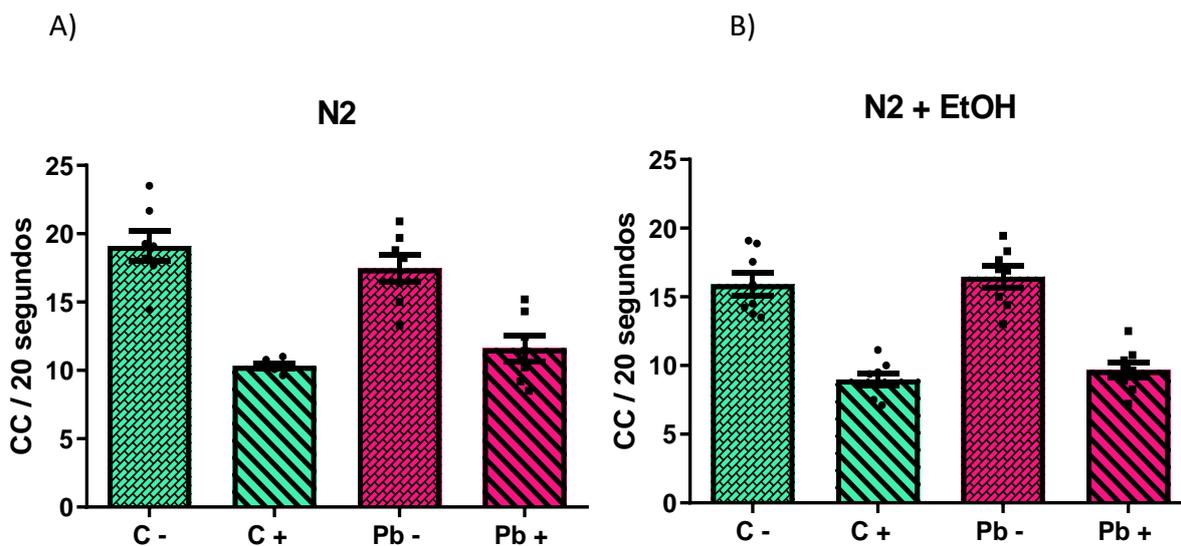


Figura 21. Número de contorsiones corporales realizados en 20 segundos en la condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga.

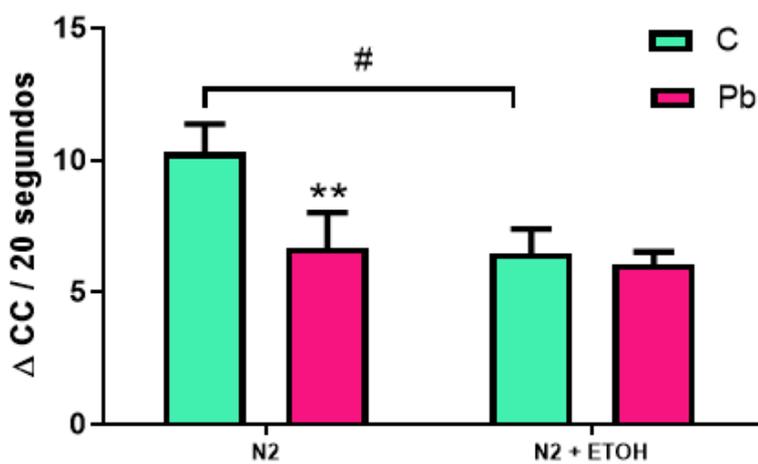


Figura 22. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento vs condición con alimento) de la cepa salvaje en la condición sin y con EtOH. ** Pb no EtOH vs C no EtOH, $p < 0,01$; y # C EtOH vs C no EtOH, $p < 0,05$.

Cepa que carece de la enzima tirosina hidroxilasa (MT15620)

En este caso se utilizaron nematodos que carecen de la enzima TH, por lo cual la síntesis de DA por esta vía estará impedida. De este modo y tal como se menciona en Sawin y cols (2000), la cepa que no sintetiza DA mediante TH puede emplearse como un “control positivo” para esta prueba, puesto que al no haber disponibilidad de DA sináptica se anticipa que los gusanos no serán capaces de discernir correctamente el cambio de textura en la superficie, y con ello se verá afectada la capacidad de enlentecer su movimiento en presencia de alimento (Sawin y cols., 2000). Sobre la base de estas consideraciones, al realizar el test de BSR en esta cepa con animales no expuestos a EtOH (figura 23 A), pudo observarse que, de acuerdo a lo esperado, la cantidad de CC fue similar, tanto en presencia como en ausencia de alimento. Este efecto, que se observó en ambos grupos, quedó evidenciado por la falta de diferencias estadísticamente significativas en la prueba de ANOVA de 2 vías. Sin embargo, cuando se realizó esta prueba en presencia de EtOH (figura 23 B), pudo observarse que ambos grupos mostraron un aumento en el número de CC, específicamente en la condición sin alimento, lo que se ve reflejado por la significancia sólo de la variable alimento ($F [1,28] = 19,27$; p valor $< 0,001$) en el análisis estadístico. Más aun, al contrastar la locomoción de estos animales entre las dos condiciones de exposición a EtOH, en el ANOVA de tres vías emergen diferencias significativas en las variables alimento ($F [1,64] = 20,97$; p valor $< 0,01$); droga ($F [1,64] = 5,93$; p valor $< 0,05$) y en las interacciones grupo x alimento ($F [1,67] = 20,6$; p valor $< 0,05$) y droga x alimento ($F [1,64] = 58,92$; p valor $< 0,01$). El análisis post hoc revela que los animales expuestos a Pb y EtOH en condiciones de ausencia de alimento, difieren de una manera estadísticamente significativa de todas las otras condiciones de animales expuestos a Pb (p valor $< 0,05$). Por otro lado, al comparar las **diferencias** de CC en condiciones con y sin alimento (figura 24), se puede visualizar un aumento en los movimientos en ambos grupos a consecuencia de la exposición a EtOH (efecto significativo en la variable droga, $F [1,29] = 12,71$; p valor $< 0,01$), lo cual indicaría que el EtOH podría estar revirtiendo la conducta observada en su ausencia. Puesto que no se obtuvo una interacción significativa en las variables grupo x droga, no se realizó una prueba post hoc.

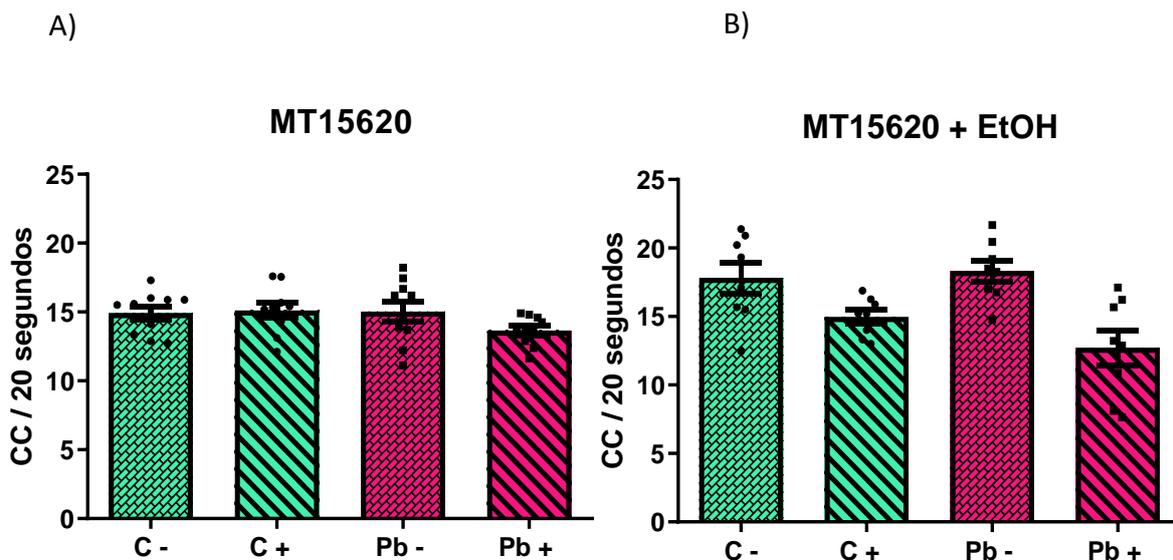


Figura 23. Número de contorsiones corporales realizados en 20 segundos en la condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga.

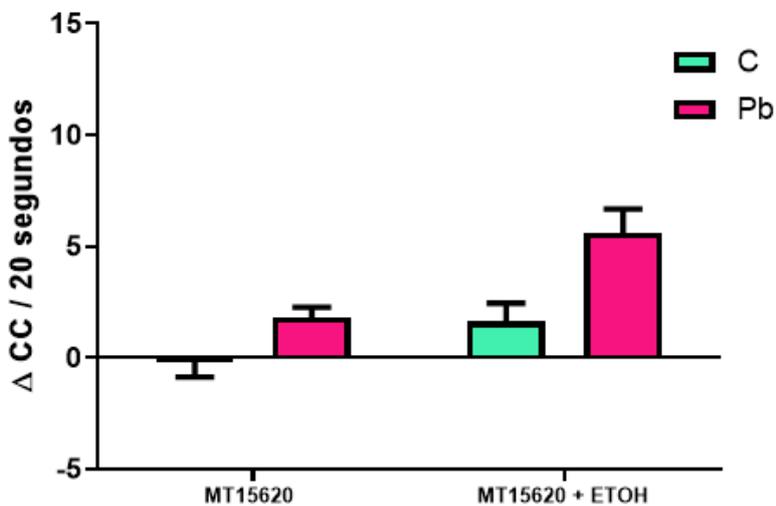


Figura 24. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa mutante nula para la enzima tirosina hidroxilasa en la condición sin y con EtOH.

Cepa que sobreexpresa tirosina hidroxilasa (UA57)

Se utilizó la cepa que sobreexpresa TH, la enzima limitante en la síntesis de DA, a fin de evaluar cómo esta variación genética modifica el comportamiento de los nematodos. Como puede observarse en la figura 25 A, en condiciones basales ambos grupos evidenciaron una disminución en el número de movimientos corporales en una placa con alimento. Sin embargo, la diferencia del movimiento entre el medio con y sin alimento fue menor en el grupo Pb. Estas afirmaciones son avaladas por la prueba de ANOVA de 2 vías, que reveló un efecto significativo en la variable alimento ($F [1,27] = 43,52$; p valor $< 0,001$) y en la interacción grupo x alimento ($F [1,27] = 5,45$; p valor $< 0,05$). Del análisis post hoc emergió que, de acuerdo a lo esperado, ambos grupos redujeron su movimiento en presencia de alimento (p valor $< 0,01$ para animales C y p valor $< 0,05$ para el grupo Pb). Cuando se realizó esta prueba con el agregado de EtOH (figura 25 B), pudo observarse un incremento en la cantidad de CC en ambos grupos, principalmente en ausencia de alimento, lo cual se evidencia en la diferencia estadística en la variable alimento ($F [1,24] = 47,03$; p valor $< 0,01$), sin que se observara una interacción estadísticamente significativa entre los grupos. Adicionalmente, de la comparación entre las condiciones en presencia o ausencia de EtOH (ANOVA de tres vías) surge una diferencia estadísticamente significativa en las variables alimento ($F [1,51] = 124,46$; p valor $< 0,001$), droga ($F [1,51] = 13,03$; p valor $< 0,001$) y en la interacción global grupo x alimento x droga ($F [1,51] = 4,24$; p valor $< 0,05$). El análisis post hoc reveló una diferencia en el grupo C no EtOH con y sin alimento (p valor $< 0,001$), al igual que en el grupo expuesto a Pb y EtOH, con y sin alimento (p valor $< 0,05$). Estos cambios fueron analizados en la figura 26, en la cual se han graficado las **diferencias** en los movimientos de ambos grupos de acuerdo a la presencia de alimento y la exposición a EtOH. El análisis ANOVA de dos vías reveló la ausencia de diferencias significativas en la variable grupo, aunque si se evidenció en la variable droga [$F (1,23) = 7,73$; p valor $< 0,05$] y en la interacción grupo x droga [$F (1,23) = 8,52$; p valor $< 0,01$]. Así, el ensayo post hoc demostró que en la condición sin EtOH, la diferencia en los movimientos del grupo expuesto a Pb fue estadísticamente menor al del grupo C (p valor $< 0,05$). Por otra parte, la exposición a EtOH aumentó la diferencia en los movimientos exclusivamente

en los nematodos expuestos al metal (p valor < 0,01), mientras que los animales C no se vieron afectados en relación a la condición no EtOH.

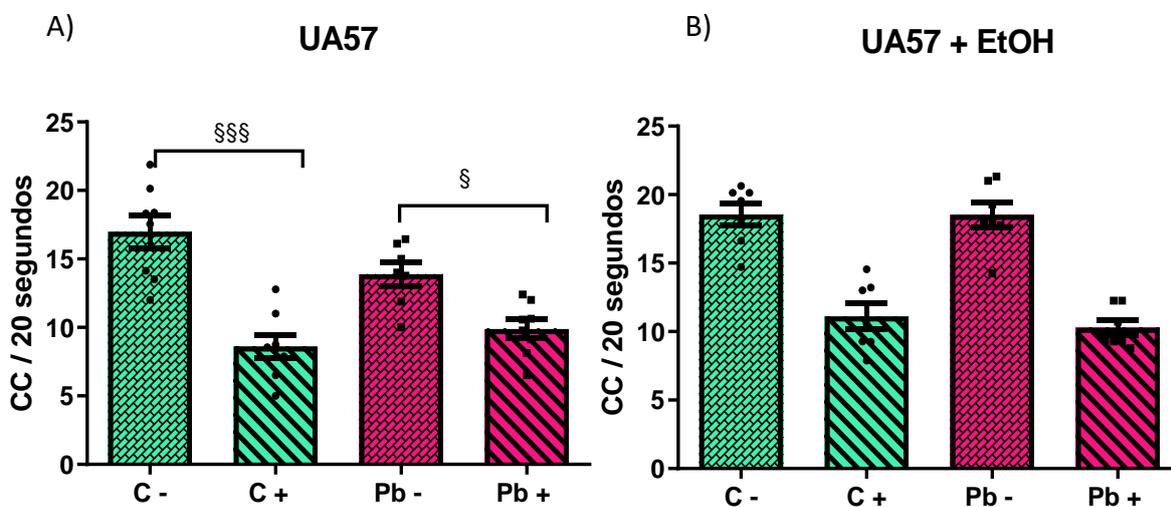


Figura 25. Número de contorsiones corporales realizados en 20 segundos en cada condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga. § alimento vs sin alimento, $p < 0,05$ y §§§ $p < 0,001$.

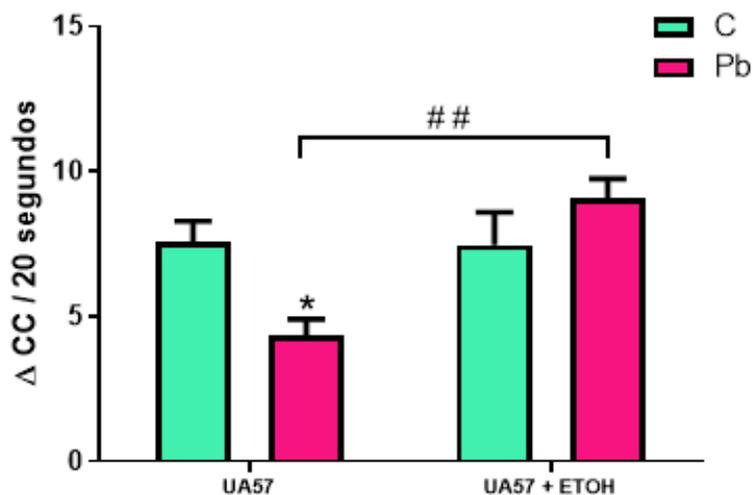


Figura 26. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa que sobreexpresa la enzima tirosina hidroxilasa en la condición sin y con EtOH. * Pb no EtOH vs C no EtOH, $p < 0,05$; y ## Pb no EtOH vs Pb EtOH, $p < 0,01$.

Cepa que carece del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) (CB1111)

En este experimento se utilizó la cepa modificada genéticamente que no expresa el transportador vesicular de monoaminas, proteína clave por su rol para incorporar DA dentro de las vesículas sinápticas. Como se observa en la figura 27 A, en presencia de alimento ambos grupos disminuyeron la cantidad de CC efectuadas en 20 segundos (efecto de la variable alimento, $F [1,22] = 32,75$; p valor $< 0,001$), aunque en el grupo Pb esta diferencia fue menor, lo que se refleja en la diferencia estadísticamente significativa en la interacción grupo x alimento ($F [1,22] = 10,92$; p valor $< 0,01$). El análisis post hoc revela que el grupo C en ausencia de alimento presenta una locomoción mayor que el mismo grupo en presencia de alimento (p valor $< 0,001$) y que el grupo expuesto a Pb en ausencia de alimento (p valor $< 0,05$). Por otra parte, en la condición resultante de la exposición a EtOH (figura 27 B), los resultados fueron similares a lo señalado anteriormente para ambos grupos, observándose una disminución de los movimientos en ausencia de alimento, lo que se manifiesta en el efecto significativo de la variable alimento ($F [1,28] = 28,47$; p valor $< 0,001$), aunque no en la interacción entre las variables. En el ANOVA de tres vías, se observa sólo una diferencia significativa en las variables alimento ($F [1,51] = 59,63$; p valor $< 0,001$) y droga ($F [1,51] = 5,26$; p valor $< 0,05$). Al analizar la **diferencia** de movimientos de cada grupo en función de la disponibilidad de alimento (figura 28), en el análisis de ANOVA de dos vías pudo observarse un efecto sólo de la variable droga ($F [1,23] = 4,72$; p valor $< 0,05$), aunque no en la interacción droga x grupo, lo que indicaría que el EtOH ejerció cambios en ambos grupos por igual, provocando en ellos un aumento en la diferencia de los movimientos corporales entre las condiciones de ausencia y presencia de alimento.

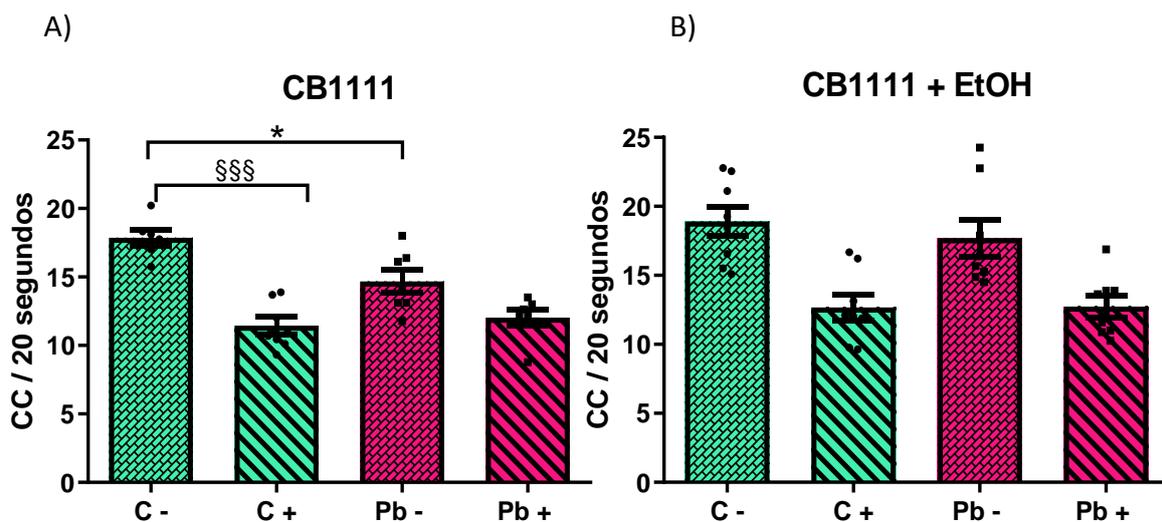


Figura 27. Número de contorsiones corporales realizados en 20 segundos en cada condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga. §§§ alimento vs sin alimento, $p < 0,001$ y * C sin alimento vs Pb sin alimento, $p < 0,05$.

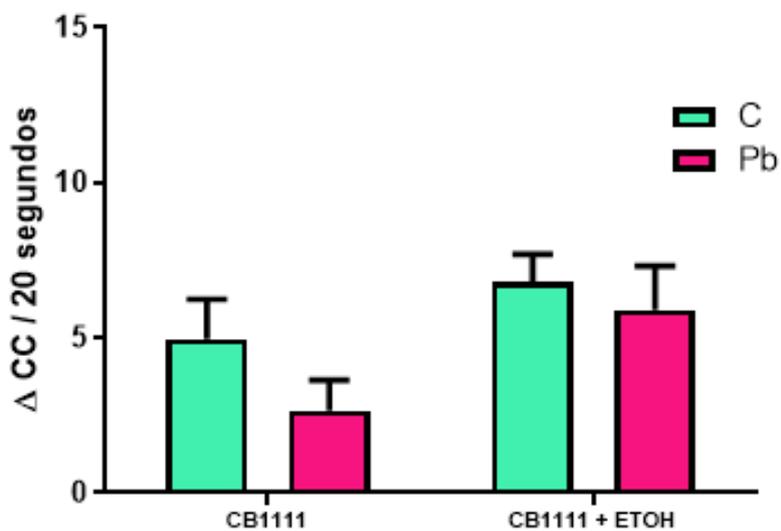


Figura 28. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa mutante para el transportador vesicular de monoaminas en la condición sin y con EtOH.

Cepa que carece de los receptores DOP-1, DOP-2 y DOP-3 (LX734)

Con el fin de evaluar el efecto de la ausencia de tres de los cuatro receptores DAérgicos descritos en *C. elegans* hasta el momento en la respuesta a esta prueba, se utilizó la cepa LX734, la cual presenta una mutación que impide la expresión de los receptores DOP-1, DOP-2 y DOP-3. En la figura 29 se muestran las contorsiones de los grupos C y Pb en cada condición (con y sin alimento, en ausencia (A) o presencia (B) de EtOH). Puede observarse que en ausencia de EtOH (figura 29 A), se evidencia una disminución en el número de CC, tanto en los animales C como en los expuestos a Pb, aunque el grupo Pb muestra una menor respuesta de movimiento entre las condiciones con y sin alimento. Estas aseveraciones son apoyadas por los resultados que emergieron de la prueba de ANOVA de 2 vías, en la cual se evidencia una diferencia en la variable alimento ($F [1,24] = 38,94$; p valor $< 0,001$) y en la interacción grupo x alimento ($F [1,24] = 6,46$; p valor $< 0,05$). La prueba post hoc demostró diferencias en el grupo C entre las condiciones con y sin alimento (p valor $< 0,001$). En presencia de EtOH (figura 29 B) sólo se evidencia un efecto significativo en la variable alimento ($F [1,32] = 5,20$; p valor $< 0,05$). En relación al grupo Pb, la figura 29 (A y B) demuestra que el agregado de EtOH no indujo cambios significativos a este grupo. Estas afirmaciones se sustentan en la ausencia de efectos significativos en la prueba del ANOVA de tres vías en todas las variables analizadas, excepto en la de alimento ($F [1,56] = 42,49$; p valor $< 0,001$). Como puede observarse a partir de la **diferencia** de movimientos de cada grupo en función de la disponibilidad de alimento (figura 30), el grupo Pb mostró una respuesta locomotora significativamente menor al grupo C. La prueba de ANOVA de dos vías mostró una interacción grupo x droga ($F (1,23) = 16,57$; p valor $< 0,001$), revelando, en ausencia de EtOH, una menor diferencia en los movimientos en las condiciones con y sin alimento en los nematodos expuestos a Pb comparado a los C (p valor $< 0,05$). Por otro lado, en presencia de EtOH, puede observarse un efecto de la variable droga, evidenciado como una disminución en la diferencia de movimientos sólo en el grupo C (p valor $< 0,001$). Estos resultados parecen indicar que la exposición a Pb en esta cepa prevendría los cambios resultantes del agregado de EtOH.

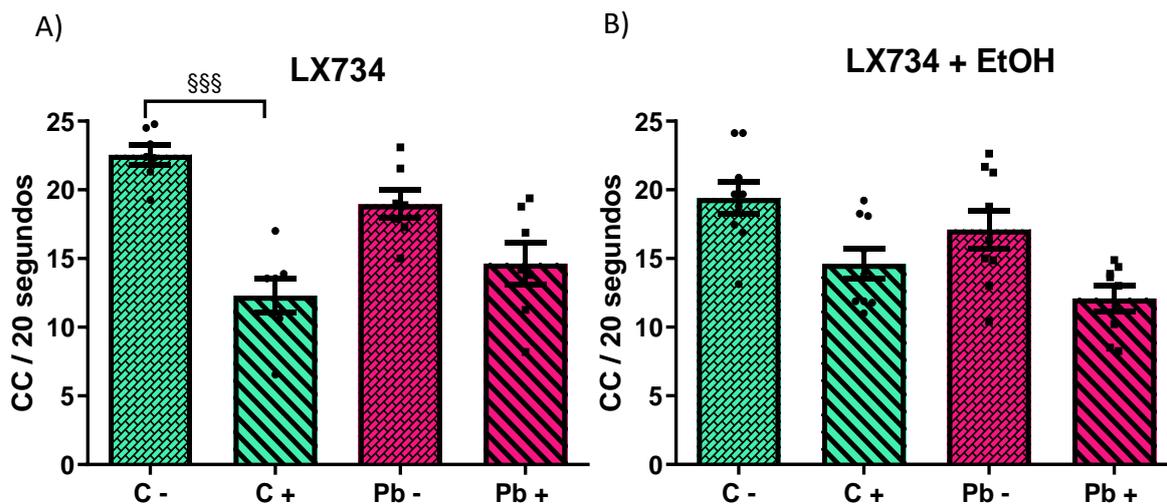


Figura 29. Número de contorsiones corporales realizadas en 20 segundos en cada condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga. §§§ alimento vs sin alimento, $p < 0,001$.

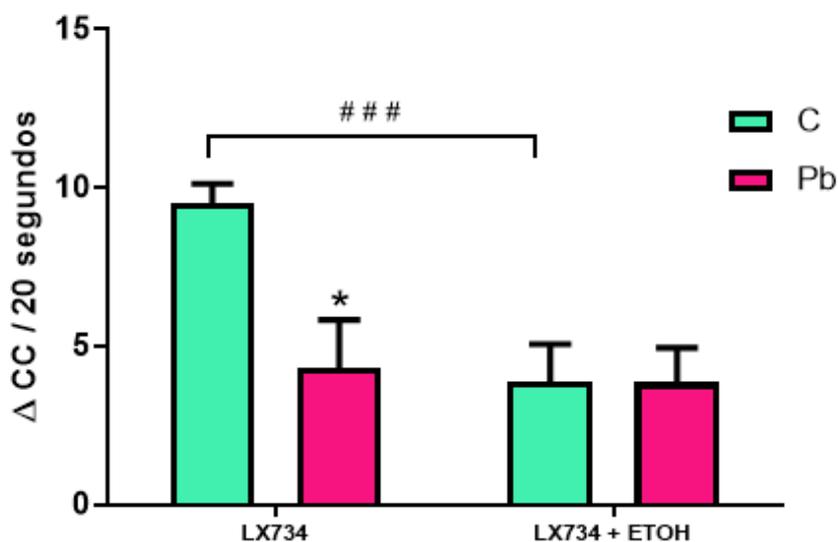


Figura 30. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa que no expresa los receptores DAérgicos DOP -1, DOP -2, y DOP -3 en la condición sin y con EtOH. * Pb no EtOH vs C no EtOH, $p < 0,05$ y ### C EtOH vs C no EtOH, $p < 0,001$.

Cepa que carece de los receptores DOP-4 (RB1254)

Otra cepa que fue evaluada a fin de aportar mayores evidencias a estos mecanismos es la RB1254, la cual carece del receptor postsináptico DOP-4. Como puede observarse en la figura 31 A, se obtuvo una disminución en la locomoción de ambos grupos de gusanos, como resultado de la presencia de alimento ($F [1,19] = 14,64$; p valor $< 0,01$), mientras que el análisis no arrojó interacción en las variables alimento x grupo. Cuando se realizó el ensayo en presencia de EtOH (figura 31 B), se observó una disminución en las CC en presencia de alimento tal como se evidencia en la diferencia significativa en esta variable ($F [1,27] = 83,61$; p valor $< 0,001$). La presencia de la interacción grupo x alimento ($F [1,27] = 7,45$; p valor $< 0,05$) reveló un efecto diferencial entre ambos grupos, evidenciando el análisis post hoc una diferencia tanto en el grupo C (p valor $< 0,001$) como en los animales expuestos a Pb (p valor $< 0,001$), entre los entornos de presencia y ausencia de alimento. El ANOVA de tres vías demostró un efecto significativo en la variable alimento ($F [1,44] = 77,58$; p valor $< 0,001$) y en la interacción grupo x alimento ($F [1,44] = 8,82$; p valor $< 0,01$). Por otra parte, el análisis estadístico de los datos mediante un ANOVA de dos vías que se muestran en la figura 32 respecto de la **diferencia** de movimientos de cada grupo reveló un efecto de la variable grupo ($F [1,22] = 19,50$; p valor $< 0,001$) y droga ($F [1,22] = 14,32$; p valor $< 0,01$), pero no de la interacción grupo x droga.

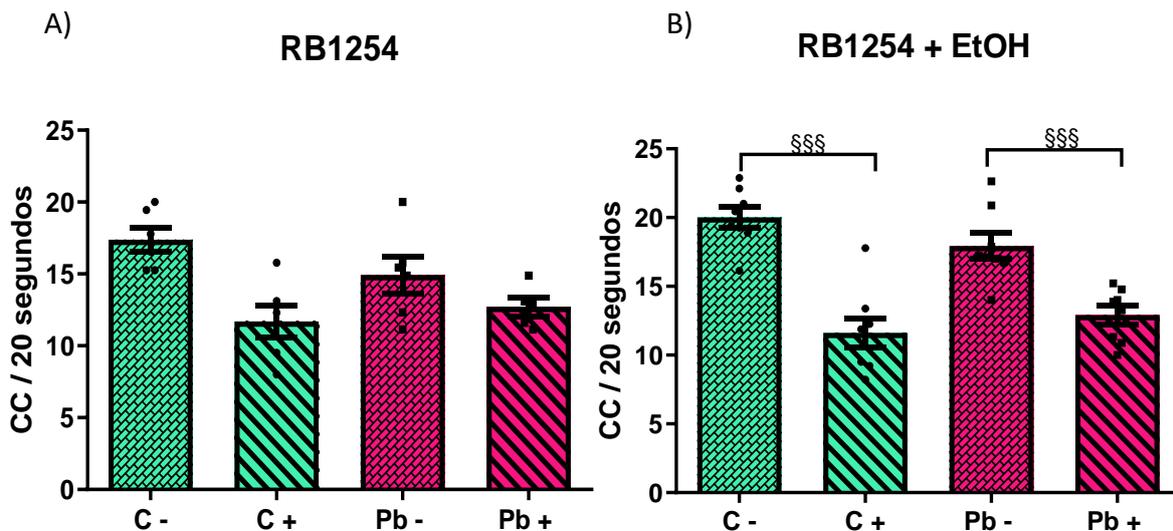


Figura 31. Número de contorsiones corporales realizadas en 20 segundos en cada condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga. §§§ alimento vs sin alimento, $p < 0,001$.

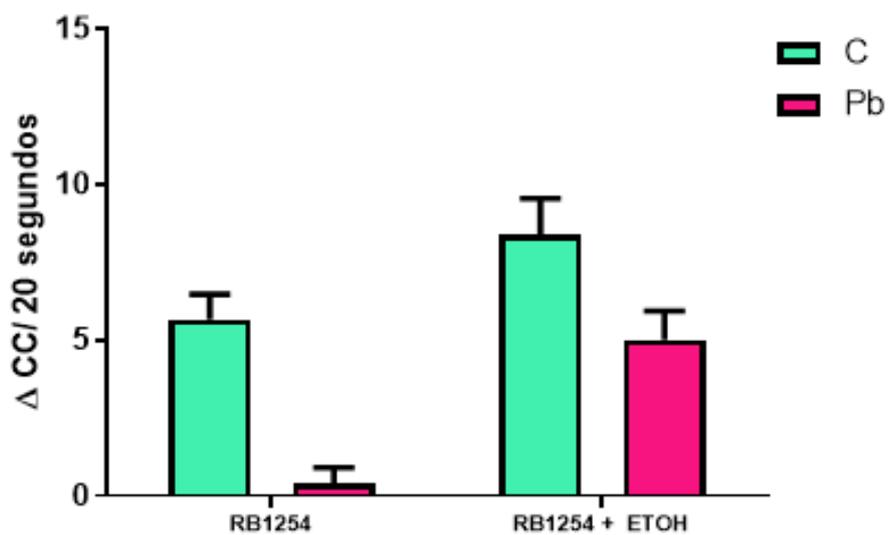


Figura 32. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa que no expresa el receptor postsináptico DOP-4 en la condición sin y con EtOH.

Cepa que carece del transportador DAT-1 (MAB398)

La última cepa estudiada fue la MAB398, que presenta la particularidad de estar genéticamente modificada para no expresar el transportador de DA en la membrana presináptica, por lo que la recaptación del neurotransmisor está impedida luego de su liberación vesicular hacia el espacio sináptico. La figura 33 A demuestra que tanto el grupo C como el grupo Pb disminuyeron su tasa de movimiento en presencia de alimento, efecto que se evidenció de manera más pronunciada en el grupo C. Es así que en los resultados del ANOVA de 2 vías emergen diferencias significativas en la variable grupo ($F [1,18] = 19,96$; p valor $< 0,001$) y alimento ($F [1,18] = 55,62$; p valor $< 0,001$) aunque no en la interacción entre ambos. De manera similar, en la condición con EtOH (figura 33 B) se obtuvieron diferencias significativas en la variable grupo ($F [1,20] = 8,36$; p valor $< 0,01$) y alimento ($F [1,20] = 34,30$; p valor $< 0,001$), sin interacción significativa entre ellos. El ANOVA de tres vías en este caso arrojó diferencias significativas para la variable grupo ($F [1,38] = 24,02$; p valor $< 0,001$), alimento ($F [1,38] = 80,90$; p valor $< 0,001$) y droga ($F [1,38] = 28,94$; p valor $< 0,001$), pero no en la interacción entre ellos. Al analizar esta conducta como la **diferencia** de movimientos entre las condiciones con y sin alimento (figura 34), puede observarse una tendencia no significativa hacia un deterioro en el desempeño en el grupo C en la condición EtOH, efecto que no se evidenció en el grupo Pb.

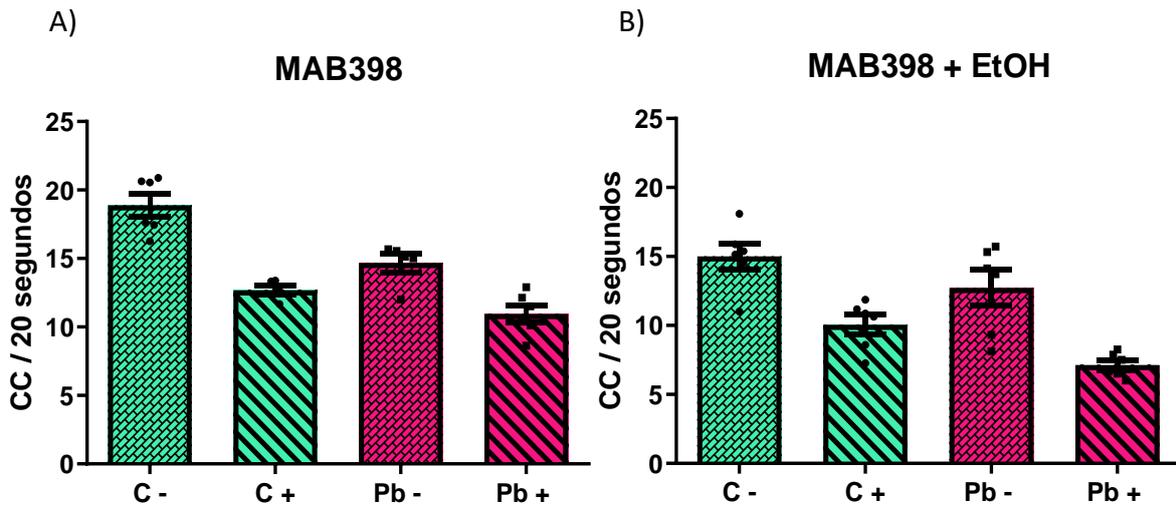


Figura 33. Número de contorsiones corporales realizados en 20 segundos en cada condición: (-) sin alimento y (+) con alimento. (A) denota la condición libre de EtOH, (B) la condición con agregado de la droga.

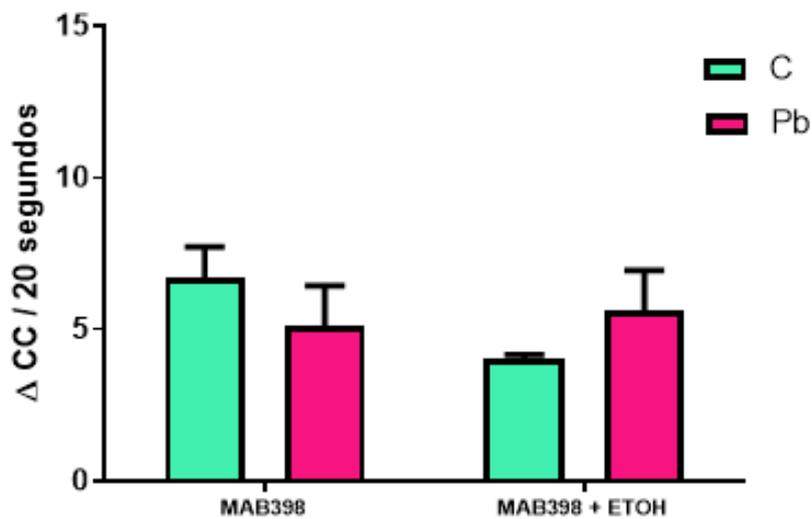


Figura 34. Diferencia en el número de contorsiones corporales (condición sin alimento - condición con alimento) de la cepa que no expresa el transportador de DA en la condición sin y con EtOH.

Discusión

Se ha mencionado en la introducción que el nematodo *C. elegans* es un modelo genético único cuyo linaje celular, neuroanatomía y secuencias genómicas han sido bien descritas. A pesar de la simplicidad relativa del sistema nervioso, presenta la habilidad de desarrollar plasticidad conductual, la cual puede subyacer procesos de aprendizaje (Calhoun y cols., 2015; Sanyal y cols., 2004).

Como se dijo previamente, el control de la locomoción se encuentra regulado no sólo por la acción de DA sino que es un proceso complejo que se vale de la acción de otros neurotransmisores como GABA, octopamina, 5-HT, Ach y Glu (Sawin y cols., 2000; Suo y cols., 2009), liberado desde interneuronas, motoneuronas y neuronas sensoriales y que en su conjunto determinan la motilidad. Asimismo, es necesario mencionar que además de la DAérgica, otras vías de neurotransmisión (5-HT, GABA, Glu) podrían también estar interviniendo en el fenómeno de una conducta alterada frente al EtOH por exposición temprana al Pb. El estudio de estos sistemas no fue abordado en este trabajo de tesis.

El presente estudio se focalizó en describir un tipo de comportamiento que en *C. elegans* ha sido asociado particularmente al sistema DAérgico, puesto que involucra una conducta de búsqueda (conocida en inglés como *seeking behavior*) de un reforzador natural como es el alimento. Sobre la base de estas consideraciones se procedió a evaluar esta respuesta en un amplio espectro de cepas de *C. elegans* genéticamente modificadas que evidencian algún tipo de alteración en alguno de los componentes de la sinapsis DAérgica.

Al respecto, y de acuerdo a lo esperado, como se evidencia en la cepa **N2** (salvaje), los gusanos del grupo C percibieron correctamente la presencia de alimento y fueron en su búsqueda, situación que determinó una disminución de la locomoción una vez que ésta fue encontrada, efecto descrito por Sawin y cols (Sawin y cols., 2000). Sin embargo, animales de la misma cepa expuestos a Pb durante etapas tempranas del desarrollo, demostraron tener una menor capacidad para alcanzar el alimento, así como para disminuir la locomoción en su presencia (figura 21 A). En relación a este resultado, y tal como se mencionó en el capítulo anterior, si bien la literatura sobre los efectos neurotóxicos de Pb sobre el sistema DAérgico de *C. elegans* es limitada, un reporte

reciente (Akinyemi y cols., 2019) demostró que gusanos en estadio L1 expuestos a altas concentraciones de acetato de Pb durante una hora manifestaron una disminución en el BSR similar a lo que observamos en este ensayo con animales expuestos a Pb durante el desarrollo. A pesar de que ambos tratamientos difieren en concentración, tipo de exposición y duración de la misma, resulta evidente que el Pb administrado tanto mediante una exposición aguda a altas concentraciones, o de manera crónica en cantidades menores, pero durante el desarrollo del individuo, es capaz de impactar negativamente sobre esta conducta. Además, este resultado guarda relación con la mayor neurodegeneración DAérgica que reportamos en el capítulo anterior. En esa sección, se observó que a 24 μ M de Pb, el número de gusanos con alteraciones a nivel de la sinapsis DAérgica fue mayor con respecto a los C, las que podrían ser suficientes para modificar una conducta dependiente de este sistema. A su vez, se ha reportado que el Pb afecta la liberación y recaptación de varios neurotransmisores controlados por canales de Ca voltaje dependientes, probablemente por una competencia por el sitio de inserción de dicho elemento relacionada a sus características de catión divalente (Bressler y cols., 1996; Suszkiw, 2004). Por otra parte, cuando se evaluó esta conducta en presencia de EtOH, pudo observarse una disminución en el desempeño de la prueba sólo en los animales C, mientras que en el grupo Pb este efecto no se evidenció (figura 22). Así, a pesar de que, según Sterken y cols (2021), a estos tiempos de exposición a EtOH predominarían los efectos sobre su metabolismo por sobre los neurales, este deterioro en la conducta podría eventualmente atribuirse a la activación ejercida por el EtOH sobre los canales BK (*canal de potasio (K) de larga conductancia activado por calcio y voltaje*, llamado también canal de potasio BK o SLO-1), causando un gran eflujo de K, hiperpolarizando la neurona y deprimiendo la excitabilidad neuronal, inhibiendo por consiguiente la liberación de DA (Sterken y cols., 2021; Zhu y cols., 2014). Sin embargo, en el grupo expuesto a Pb se observa que la exposición a EtOH no provocó un mayor deterioro de esta conducta, aunque tampoco se observó un mejoramiento de la misma. La posible explicación de esta observación es que el EtOH no sería capaz de facilitar la liberación de DA en una sinapsis que en condiciones basales ya evidencia alteraciones estructurales inducidas por Pb, como fue demostrado en el experimento presentado en el capítulo anterior. Además, al analizar los valores absolutos de las CC de los nematodos, se evidencia que el EtOH en estas condiciones y a estos tiempos de

exposición no modificó la motilidad de los gusanos, por lo cual no podría atribuirse este resultado a un efecto sedativo que pueda estar impidiendo la llegada de los gusanos al sitio en el que se encuentra presente el alimento.

Por otra parte, es necesario mencionar que se ha reportado que DA en este nematodo se comportaría también como una neurohormona. Esto se evidencia por el hecho de que las 8 neuronas DAérgicas en *C. elegans* hacen sinapsis con otras 41 neuronas en el cuerpo, y con sólo 1 de las 58 neuronas del CV (White y cols., 1986). Así, la DA en *C. elegans* podría difundir en un sitio alejado del lugar donde se libera, actuando de esta manera como una hormona, incluso algunos receptores de DA ejercerían su actividad de una manera independiente del ligando (Sanyal y cols., 2004). Estas evidencias sugerirían que la síntesis de este neurotransmisor en un tipo celular determinado puede no ser crítica para regular la totalidad de las funciones mediadas por DA (Chase y cols, 2004). Además, las neuronas DAérgicas de *C. elegans* contienen el transportador DAT-1 (originalmente llamado CeDAT, por su expresión en *C. elegans*), por lo cual la DA sintetizada en otros sitios puede ser recaptada en estas neuronas y participar en su liberación en la sinapsis DAérgica (Jayanthi y cols., 1998; McDonald y cols., 2006).

En cuanto a la cepa **MT15620** mutante nula para TH (*cat-2* en *C. elegans*), no tendría la capacidad para sintetizar DA, por lo que cumpliría un rol de “control positivo” para el ensayo de BSR (Sawin y cols., 2000), es decir, la cepa cuya conducta confirma que ante una deficiencia de DA, el gusano no discrimina entre los entornos con y sin alimento. Esto responde a que el organismo bajo estudio carecería de este neurotransmisor y por lo tanto el efecto final, que es el enlentecimiento de la locomoción en presencia de alimento, no se percibiría, evidenciando la disfunción DAérgica. Esta aserción se corresponde con lo que se obtuvo en el ensayo, donde en condiciones basales, es decir en ausencia de EtOH, tanto el grupo C como el expuesto a Pb no evidenciaron una conducta de enlentecimiento frente a la comida. No obstante, cuando se replicó la prueba con agregado de EtOH, se observó en ambos grupos una leve mejora en la discriminación de las condiciones de alimento (figura 24), manifestándose un enlentecimiento de la conducta, aun en ausencia de DA sintetizada por la vía de la TH. Una posible explicación a este resultado se desprende en el contexto de que se ha descrito que las cepas mutantes para *cat-2* no serían completamente

deficientes para DA. Se ha demostrado que estas cepas (incluyendo a MT15620 y CB1112) pueden sintetizar alrededor de un 40% de la DA que sintetiza la cepa salvaje a través de vías que no involucran la enzima TH (Sanyal y cols., 2004), evidencia que también se ha demostrado en ratones deficientes de TH (Rios y cols., 1999). Incluso la cepa MT15620, que presenta una delección de alrededor de 1000 pares de bases en el gen *cat-2*, sintetiza un 60% de DA, comparado a la CB1112, que presenta una mutación puntual y sintetiza entre el 30-40% (Smith y cols., 2019). Por lo tanto, es posible que, en condiciones basales, la DA presente en el gusano podría no ser suficiente para generar el efecto de enlentecimiento, pero que ante un estímulo exógeno que potencie una liberación de DA, como puede ser el EtOH, se promovería la generación de DA extrasináptica (Sanyal y cols., 2004). Esta posibilidad podría en parte explicar el hecho de que los gusanos sean capaces de percibir el estímulo del alimento y actuar frente a él. Por otra parte, y a partir del análisis de los valores absolutos (figura 23), en todos los casos puede observarse que el patrón de enlentecimiento no se produjo a expensas de una sedación general en todas las condiciones, sino a una disminución propiamente dicha de la locomoción del gusano cuando se enfrentó con el alimento. Alternativamente, y como se mencionará más adelante, existe la posibilidad de que el agregado de EtOH a las placas en las que se realiza esta conducta determine una respuesta independiente de la liberación de DA y solo mediada por la interacción directa de la droga con el receptor DOP-4 (Topper y cols., 2014).

Con respecto a la cepa **UA57**, que sobreexpresa TH, pudo observarse que en ausencia de EtOH ambos grupos se comportaron siguiendo el mismo patrón que la cepa salvaje, más específicamente el grupo Pb evidenció una menor tasa de enlentecimiento respecto de su control (figura 25 A). Por lo tanto, la síntesis incrementada de DA endógena no impactaría directamente en esta conducta en estas condiciones experimentales. Interesantemente, cuando se agregó EtOH al medio, el resultado varió significativamente en relación a la cepa salvaje (figura 25 B). Es así que el grupo Pb se comportó distinto respecto de la condición sin EtOH, de manera tal que la diferencia en el enlentecimiento basal se incrementó notablemente, es decir que el EtOH mejoró esta respuesta en los gusanos expuestos a Pb. Sin embargo, el efecto en el grupo C fue diferente al observado en la cepa salvaje, ya que mientras en ese caso el EtOH redujo la diferencia entre ambas condiciones en los controles, en estas condiciones el efecto no

fue observado (figura 26). Una de las posibilidades que explicarían este resultado podría relacionarse a que la cepa UA57, al sintetizar niveles mayores de DA, podría estar revirtiendo la alteración que generaba el EtOH en el grupo C, llegando a un efecto similar al grupo C no expuesto al EtOH de esta cepa. El exceso de DA presináptica en presencia de EtOH estaría previniendo el deterioro evidenciado en la cepa salvaje, no sólo en el grupo C, sino particularmente en los animales expuestos a Pb en los que mejoró notablemente el desempeño de la prueba. Estos resultados aportan evidencias del rol desempeñado por la DA presináptica en la modulación de esta conducta en presencia de una droga que favorece su liberación.

En relación a la cepa **CB1111**, deficiente de *cat-1* (*knock out* para VMAT), cabe mencionar que existe sólo un gen que codifica para VMAT en *C. elegans* (Rand y cols., 2000). Éste posee un 47% de homología con VMAT1 y 49% con VMAT2 y se expresa primariamente en la región sináptica de 25 neuronas: 8 DAérgicas, 11 serotoninérgicas y en otras sin especificar (Duerr y cols., 1999). No obstante, un rasgo notable es que en el gusano dicho transportador muestra mayor homología con la isoforma VMAT2 de mamíferos, que es neuronal, que con VMAT1, que cumple más bien un rol “neuroendócrino”. Además, VMAT de *C. elegans* presenta mayor afinidad a DA que a 5-HT (Duerr y cols., 1999). El transporte de aminas desde el citosol hacia las vesículas se encuentra asociado a un gradiente de pH acoplado a un antiporter de protones (H⁺), donde al ingresar DA, se liberan al espacio citosólico dos H⁺ (Duerr y cols., 1999; Young y cols., 2018). Cuando el almacenamiento de DA se encuentra desregulada, dicha molécula se acumula en el citosol, donde resulta vulnerable a la oxidación y al catabolismo enzimático. Este proceso genera metabolitos reactivos, tales como quinonas y EROs (Bradner y cols., 2021; Stokes y cols., 1999), lo cual en última instancia produce citotoxicidad.

En *C. elegans*, el análisis metabólico de la cepa mutante para *cat-1* pone en evidencia vías alteradas del metabolismo de la tirosina, que pueden deberse al mal funcionamiento de la incorporación de DA a las vesículas (Bradner y cols., 2021). Dicha cepa manifiesta niveles más bajos de DA en los procesos neuronales, e incrementados en los cuerpos celulares (Sulston y cols., 1975), así como un mayor número de metabolitos de DA (Bradner y cols., 2021). Si bien se ha reportado que la pérdida de VMAT replica el fenotipo de la cepa mutante de *cat-2* en el BSR (Bradner y cols., 2021)

a expensas de un sistema DAérgico alterado (Duerr y cols., 1999, Young y cols., 2018), estudios demuestran la existencia de hasta un 40% de DA en estas cepas mutantes (Duerr y cols., 1999; Rand y cols., 2000; Sulston y cols., 1975). Esta evidencia podría explicar los resultados obtenidos con la cepa CB1111, que demostró una pérdida parcial de la función DAérgica con ausencia de diferencias significativas en el perfil de desempeño de ambos grupos (figura 28), excepto el evidenciado por una menor discriminación en valores absolutos en relación a animales N2. Por otro lado, en el grupo expuesto a Pb, la ausencia del efecto facilitador del EtOH en el desempeño de la conducta observada en cepas que poseen una alteración en el sistema DAérgico podría guardar relación con evidencias que reportan que la exposición a Pb genera en ratones una disminución en la expresión de VMAT (Fortune & Lurie, 2009), efecto que podría intensificar el ya existente por la mutación.

Por otra parte, y en relación al rol de los receptores DAérgicos pre y post sinápticos, como se mencionó previamente, las investigaciones de Allen establecen que el receptor DOP-3 pertenece a la familia de D2R, que actúan a través de la proteína $G\alpha_o$ para ejercer un efecto inhibitorio sobre motoneuronas colinérgicas y GABAérgicas de *C. elegans*. De manera opuesta, DOP-1 pertenece a la familia de D1R, y a través de la proteína $G\alpha_q$ ejerce un efecto antagónico a DOP-3, es decir, estimula la liberación de Ach, pero sólo desde neuronas colinérgicas (figuras 16 y 17). Así, la activación de DOP-3 sería la responsable de la inhibición de la locomoción en presencia de alimento, a partir de una disminución en la liberación de Ach desde las motoneuronas del CV del gusano, mientras que la activación de DOP-1 estaría potenciando la liberación de Ach y por lo tanto estimulando la locomoción. No obstante, en presencia de alimento o de DA exógena, la activación de DOP-1 desde neuronas colinérgicas podría resultar enmascarada por la activación de DOP-3 desde motoneuronas GABA y colinérgicas. Además, el Ca por sí mismo podría ser un importante regulador en la modulación mediada por DOP-1 en las respuestas mecanosensoriales (Kindt y cols., 2007).

En cuanto al receptor DOP-2, a pesar de que un estudio reciente de Formisano (2020), reportó que las mutantes *dop-2* producen una acumulación de DA en la sinapsis (Formisano y cols., 2020), se ha reportado que la mutación nula no afecta el BSR (Krum y cols., 2020) o que tiene poca incidencia en la locomoción cuando se combina con otras mutaciones (Chase y cols., 2004). Interesantemente, en la investigación de Chase y cols,

los gusanos dobles mutantes nulos para *dop-1* y *dop-3*, en lugar de mostrar una resistencia a la parálisis inducida por la administración de DA exógena, como se vio en los mutantes nulos sólo de *dop-3*, resultaron mostrar una sensibilidad similar vista a la cepa salvaje. Esto indica que la administración de DA exógena activó tanto DOP-1 como DOP-3 para ejercer efectos antagónicos en la locomoción. Cabe señalar que la administración de DA exógena ejerce sus efectos paralizantes por la misma vía de señalización que la usada por la DA endógena para disminuir la locomoción (es decir por una hiperactivación de DOP-3) (Allen y cols., 2011; Chase y cols., 2004). Lo detallado anteriormente explicaría los resultados obtenidos en la cepa **LX734** (con mutación nula en los receptores DOP-1, DOP-2 y DOP-3) en ambos grupos, donde no se observaron diferencias respecto de la cepa salvaje en ausencia de EtOH, posiblemente por una combinación de la ausencia simultánea de efectos inhibitorios y estimulatorios, o incluso por un efecto neto cuyo resultado final es el equilibrio de ambos estímulos. Sin embargo, en presencia de EtOH, el desempeño en el ensayo se vio afectado en ambos grupos (figura 30). Esto podría indicar que la DA liberada resultante de la administración de EtOH, necesitaría de la presencia de estos receptores (DOP-1 y DOP-3) para actuar y poner de manifiesto esta conducta, tal como se observa en la cepa N2. Sin embargo, es necesario considerar también evidencias que indican que en ensayos de parálisis de la locomoción inducida por la administración de DA exógena, la triple mutante *dop-1*, *dop-2* y *dop-3*, presentó la misma sensibilidad a estas respuestas que las mutantes *dop-1*, *dop-3*. Por lo tanto, DA podría ejercer algunos de sus efectos a través de receptores diferentes a los mencionados anteriormente y que aún no han sido caracterizados en *C. elegans* (Chase y cols., 2004).

Todo lo expresado anteriormente podría explicar los resultados obtenidos con la cepa **RB1254**, que presenta, a diferencia de la LX734, una mutación nula sólo para DOP-4, perteneciente a la familia de D1R que estimulan la locomoción. Se ha demostrado que la iniciación de los movimientos de ondulación en *C. elegans* depende de los D1R, que incluye a DOP-1 y DOP-4, como se ha evidenciado en la cesación del movimiento luego de la inmersión en agua de mutantes que carecen de estos receptores (Vidal-Gadea y cols., 2012). Del análisis del gráfico 32 se desprende que, en ausencia de EtOH, los animales C mostraron un patrón similar al de la cepa salvaje, pero en valores notablemente menores, lo cual sugeriría que esta conducta está parcialmente afectada

por la ausencia del subtipo DOP-4. Sin embargo, los gusanos expuestos a Pb se comportaron de manera similar a las mutantes nulas de *cat-2*, revelando el rol crítico de este receptor en la sinapsis DAérgica de estos animales. Esto coincide con lo reportado por Ardiel y cols, donde se demostró que en la habituación al golpeteo, una conducta también dependiente de DA, las mutantes nulas de *cat-2* (enzima TH) muestran un fenotipo conductual muy similar a las mutantes nulas de *dop-4* (Ardiel y cols., 2016). Más aun, si bien DOP-4 es un receptor del tipo D1, lo mismo que DOP-1, se vio que el primero ejerce un efecto diferencial sobre la conducta mediada por DA, debido a que *dop-1* y *dop-4* se expresan sobre células distintas, generando respuestas diferentes. Interesantemente, los resultados demuestran que la exposición a EtOH revierte de manera significativa las limitaciones en el desempeño de esta prueba en ambos grupos, sugiriendo que el exceso de DA presente en la sinapsis, que responde a la presencia de EtOH, estaría de alguna manera compensando la falta del sitio de unión postsináptico a DA. Una explicación alternativa recae en las evidencias que demuestran que la exposición aguda a EtOH desinhibe muchos comportamientos en un amplio rango de seres vivos, la cual se produciría mediante los D1R y en particular DOP-4 en *C. elegans*, probablemente por una interacción directa sobre este receptor, independientemente de la liberación de DA (Topper y cols., 2014). La descripción de este mecanismo provee evidencias del rol de DA y/o sus receptores en los efectos del EtOH, aunque futuros estudios deberían considerar acciones de esta droga a través de mecanismos independientes a la liberación de DA.

Finalmente, cabe mencionar que mutaciones en los genes que codifican el recaptador DAT-1, producen una acumulación de DA extrasináptica (McDonald y cols., 2006, 2007). Se ha reportado que los niveles sinápticos de DA son mantenidos tanto por la regulación del autorreceptor DOP-2 como por la actividad de DAT-1, que recicla la DA presente en la hendidura sináptica y la recupera a la célula presináptica (Benoit-Marand y cols., 2000; Pandey y cols., 2021). Los niveles de expresión de DAT-1 difieren en cada conjunto de neuronas: la mayor expresión de DAT-1 se produce en neuronas CEP, siguiendo las de neuronas ADE y con una reducida expresión en las PDE (McDonald y cols., 2007), lo que podría representar un elemento regulatorio en estas células. Más aun, en coincidencia con esto, las neuronas CEP que poseen mayor expresión de DAT-1 son las principales implicadas en la conducta de percepción del alimento, al enviar las

proyecciones dendríticas hacia la nariz del animal, donde recibe el estímulo y se transmite la señal hacia las motoneuronas (Sawin y cols., 2000). La pérdida de DAT-1 en la línea *dat-1* mutante, puede, por lo tanto, añadir una nueva fuente de DA extrasináptica procedente de neuronas CEP y ADE, normalmente limitada para las acciones sinápticas por el transportador. Así como pudo observarse en el ensayo de BSR con la cepa **MAB398** (mutante nula para DAT-1) en condiciones basales, es decir sin la presencia de EtOH en el medio (figura 33 A), las diferencias de CC en cada condición de alimento varían en ambos grupos, aunque en el C es menor al observado en la cepa salvaje. Ante el agregado de la droga, la tendencia del grupo C es a decaer la capacidad de enlentecimiento mientras que en el grupo Pb no se modifica en relación a la condición observada en ausencia de EtOH (figura 34). El deterioro de esta conducta dependiente de DA observada en los animales expuestos a Pb no fue revertida, como se observó en cepas evaluadas anteriormente ante el agregado de EtOH. Al respecto, cabe mencionar que la regulación de las proteínas DAT está estrechamente controlada por múltiples proteínas que interactúan entre sí, así como por vías vinculadas a quinasa/fosfatasa (Melikian, 2004; Foster y cols., 2006). De hecho, el Pb, al tratarse de un metal divalente que puede desplazar otros metales con el mismo estado de oxidación, podría estar interfiriendo en la actividad de dichas enzimas, dando como resultado final una vía de señalización alterada y por ende una desregulación de DAT-1.

Para concluir, se puede evidenciar que el análisis del sistema DAérgico en *C. elegans* ha revelado una considerable conservación con el mismo sistema en mamíferos. Este gran número de similitudes entre ambos sistemas sugieren que *C. elegans* podría servir efectivamente como un modelo para estudiar las bases moleculares de conductas y desordenes relacionados con la exposición a metales tóxicos y sus efectos subsecuentes sobre sistemas neuronales (como el DAérgico) y respuestas a drogas de abuso.

En su conjunto, el estudio del perfil de la sinapsis DAérgica en este paradigma conductual posicionan a la DA como un posible interruptor maestro, capaz de alterar el comportamiento de un organismo, inhibiendo y promoviendo una serie de efectos motores en función del contexto, el ambiente y la historia previa de la vida del animal (Vidal-Gadea & Pierce-Shimomura, 2012).

CAPÍTULO 3: TOLERANCIA FUNCIONAL AGUDA Y QUIMIOTAXIS

Actividad locomotora de *C. elegans* en respuesta a Etanol, Acetaldehído o a la combinación Etanol/Acetaldehído

Introducción

Es conocido que la exposición aguda al EtOH induce respuestas bifásicas en los seres vivos que se presentan en función de la dosis absorbida y sus efectos a nivel del SNC (Hendler y cols., 2013; Pohorecky, 1977). En los seres humanos provoca hiperactividad y euforia a dosis bajas, mientras que a dosis elevadas produce deterioro de la coordinación y el equilibrio, sedación e incluso la muerte (Zhu y cols., 2014). La observación de estos comportamientos puede ser un indicador muy sensible de la toxicidad, pero en los organismos superiores es muy compleja y, por lo tanto, difícil de cuantificar. Frente a estas consideraciones, *C. elegans* permite la evaluación de comportamientos simples que se evidencian principalmente como alteraciones en la locomoción, medibles como cambios en la velocidad o la dirección del movimiento y que guardan estrecha relación con los comportamientos observados en humanos. Al respecto, se ha demostrado que gusanos expuestos a EtOH mostraron en el primer momento hiperactividad seguida de inmovilidad, la cual es revertida cuando estos gusanos son retirados del EtOH (Wu y cols., 2020). Del mismo modo, concentraciones bajas de la droga (17 - 52 mM) producen hiperactividad, en tanto que concentraciones entre 100 y 400 mM de EtOH ponen de manifiesto una disminución en la motilidad (Dhawan y cols., 1999; Morgan & Sedensky, 1995; revisado en Scholz & Mustard, 2013).

Se ha reportado que *C. elegans* presenta respuestas conductuales a los efectos agudos del EtOH comparables a las de especies superiores (Davies y cols., 2003). En este modelo animal la exposición aguda a EtOH causa una depresión en la locomoción y en el comportamiento de puesta de huevos dependiente de la dosis y a la misma concentración interna de EtOH que induce intoxicación en humanos y otros mamíferos (Alaimo y cols., 2012). Interesantemente, la exposición continua a esta droga genera el desarrollo de un fenómeno comportamental representativo de plasticidad neuronal denominado “tolerancia funcional aguda” (TFA) (Davies y cols., 2004), descrita por primera vez en roedores en LeBlanc y cols., 1975.

Existen varias clases de tolerancia definidas por el tiempo (aguda, rápida y crónica), el patrón de exposición (constante vs. intermitente) o por los diferentes niveles

de complejidad biológica (molecular, celular, comportamental/funcional). La tolerancia funcional ocurre luego de la exposición a drogas de abuso y se caracteriza por un efecto reducido de la droga en un parámetro comportamental, ya sea por una alteración en el metabolismo de la droga o por una alterada funcionalidad en la que los efectos de la droga disminuyen a pesar de que su concentración permanece inalterada, lo que determinará que se produzca un escalamiento en el consumo para mantener el efecto deseado. La TFA ocurre dentro de minutos de la exposición a la droga y se considera que podría ser un marcador de probabilidad de desarrollo futuro de AUD en humanos. La tolerancia crónica es la disminución en la sensibilidad que se desarrolla como resultado de exposiciones repetidas a una droga y que es medida en días o semanas, más que minutos (Pietrzykowski & Treistman, 2008).

En relación a las bases genéticas de estos comportamientos, debido a la importante conservación de los genes relacionados a los componentes del SNC entre *C. elegans* y los seres humanos (Wolf & Heberlein, 2003), los efectos del EtOH sobre diferentes comportamientos han podido ser estudiados en estos organismos (Khanh, 2018). Muchos de los genes que se encuentran relacionados con el nivel de respuesta que exhiben los nematodos frente al EtOH también están presentes en organismos superiores, inclusive en humanos (Bettinger & Davies, 2014). Hasta el momento, se han identificado más de 50 genes en *C. elegans* que participan en los comportamientos inducidos por esta droga, lo que ha determinado que se proponga a este organismo como una plataforma para descubrir genes involucrados en el AUD. A este respecto, en un trabajo reciente (Sterken y cols., 2021) se evidenció el curso temporal de la exposición a 400 mM de EtOH, lo que indujo perfiles transcripcionales diferentes y que, de acuerdo a lo esperado, un mayor número de genes mostraron estar regulados a períodos más largos de exposición. Es así que exposiciones cortas al EtOH (hasta de 2 hs) indujeron la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de esta droga (en particular de ADH), en tanto que exposiciones más largas (8 hs) tuvieron efectos mucho más profundos en el transcriptoma, incluyendo genes implicados en la función neuronal, en el microambiente lipídico y en las respuestas fisiológicas a esta droga, incluyendo blancos directos del EtOH (Sterken y cols., 2021).

Las respuestas comportamentales a la exposición aguda a EtOH en invertebrados y en humanos están bastante conservadas: dosis bajas de EtOH inducen locomoción o

estimulación psicomotora, mientras que dosis moderadas de EtOH producen sedación; del mismo modo, la tolerancia al EtOH es también observada en organismos modelos de experimentación (revisado en Grotewiel & Bettinger, 2015). Al respecto, es conocido que el EtOH produce un efecto sedativo en los nematodos a dosis internas que se correlacionan con dosis intoxicantes en los humanos (Alaimo y cols., 2012; McIntire, 2010), lo que pone en relieve las similitudes mecánicas que regulan los comportamientos inducidos por EtOH en ambas especies. Incluso se ha demostrado que *C. elegans* muestra algunos rasgos fundamentales de los síntomas de abstinencia de EtOH observados en animales superiores, incluyendo los seres humanos (Scott y cols., 2017). Es decir, los comportamientos se ven alterados tras la retirada de una exposición prolongada al EtOH, y estas alteraciones pueden revertirse parcial o totalmente mediante la reexposición a una dosis baja de la droga (Scott y cols., 2017). También se ha reportado que el EtOH genera una serie de alteraciones no sólo en las conductas asociadas al movimiento sino en otros parámetros, como la reproducción y la esperanza de vida (Davis y cols., 2008).

Los primeros reportes indican que altas concentraciones de esta sustancia generan un efecto de inmovilización en los gusanos que es reversible en el tiempo cuando se recuperan de dicha intoxicación (Morgan & Sedensky, 1995). Al respecto Davis y cols (2008), realizaron un gran aporte al estudiar los efectos de la exposición a EtOH de manera crónica o aguda durante el desarrollo, así como también crónica en estadios larvales más avanzados. Cuando la exposición ocurrió durante el desarrollo y de manera crónica, resultó en un retraso temporal del crecimiento del cuerpo, una ralentización del desarrollo, un retraso en el inicio de la madurez reproductiva, y una disminución en la fecundidad y la longevidad. Por otra parte, cuando esta exposición se produjo en etapas más avanzadas, generó una disminución en el tamaño corporal, y una disminución en la fertilidad reproductiva y la esperanza de vida. Por último, la exposición de los nematodos en diferentes estadios embrionarios, pero a altas concentraciones de EtOH administradas de manera aguda, resultó en una menor probabilidad de que los huevos eclosionen, y los que sí lo hicieron presentaron alteraciones morfológicas y fisiológicas (Davis y cols., 2008). McIntire, por su parte, reportó una disminución en la actividad locomotora, en la amplitud de la contorsión del cuerpo y una menor frecuencia en la puesta de huevos en respuesta a concentraciones crecientes de EtOH. Más aun,

durante la abstinencia, los gusanos mostraron una postura alterada y un deterioro en la capacidad de dirigirse hacia el alimento (McIntire, 2010). Resultados similares ya habían sido reportados por este mismo grupo, demostrando que la locomoción de los nematodos disminuye de manera dependiente de la dosis ante la exposición a EtOH. En este estudio incluso se diseñaron experimentos para aislar cepas mutantes y resistentes a estos efectos con el fin de aportar evidencias sobre los genes implicados en estas respuestas (Davies & McIntire, 2004). Respecto a estos resultados, se reportó la participación de *slo-1*, un gen altamente conservado que codifica para el *canal de K de larga conductancia activado por calcio y voltaje* (llamado también canal de potasio BK o SLO-1, homólogo al del ser humano). El EtOH activa los canales BK, por el cual se produce la salida de K hacia el espacio extracelular, hiperpolarizando las neuronas e inhibiendo la excitabilidad neuronal, lo que es una de las causas principales de las respuestas agudas en los gusanos y resulta en la ralentización de la locomoción y la incoordinación (Crowder, 2004). Mutaciones en dicho gen producen resistencia a los efectos del EtOH sobre la locomoción cuando se encuentra sobreexpresado (Davies y cols., 2003). Interesantemente, muchas de las respuestas asociadas con la abstinencia a esta droga luego de la interrupción de una exposición crónica a EtOH también parecen estar moduladas por la expresión de este gen (Scott y cols., 2017).

Como se mencionó previamente, la plasticidad conductual provocada por EtOH en organismos superiores es también reproducible en *C. elegans* y se lo conoce como TFA. Ésta se pone en evidencia cuando los gusanos recuperan parte de su movilidad luego de la sedación (conocida como “sensibilidad inicial”, la cual que se manifiesta como una disminución de la velocidad de movimiento o locomoción en una superficie sólida de agar) que les produce la exposición a concentraciones altas de EtOH (Davies y cols., 2015; Raabe y cols., 2014). La plasticidad neuronal, y los mecanismos subyacentes a la TFA representan una respuesta compensatoria al insulto ambiental provocado por las acciones del EtOH (Raabe y cols., 2014).

Las respuestas a esta droga también pueden estar condicionadas por factores tales como el ambiente lipídico en el que se encuentran los nematodos (Bettinger y cols., 2012; Raabe y cols., 2014), la osmolaridad de la solución de EtOH a la cual se exponen (Alaimo y cols., 2012), el medio en el que se encuentran, ya sea líquido como sólido

(Topper y cols., 2014) y la regulación por parte de múltiples genes (Kwon y cols., 2004), cuyo estudio excede al propósito de esta tesis.

Estas evidencias ponen de manifiesto que *C. elegans*, a pesar de sus limitaciones, es una poderosa herramienta no sólo para identificar períodos críticos del desarrollo en los cuales el EtOH podría causar retardos subsecuentes (Lin y cols., 2013), sino también puede utilizarse para identificar factores epigenéticos, genes y/o proteínas que regulan los efectos relacionados con el EtOH y que podrían funcionar como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de los trastornos por consumo de esta droga de abuso (Khanh, 2018).

El experimento que se menciona a continuación se basó en el protocolo descrito por Davies y cols, en los cuales se ha registrado la velocidad relativa de gusanos expuestos a EtOH frente a un grupo no expuesto, tanto a los 10 como a los 30 minutos, de manera tal de evidenciar si desarrollan o no el fenómeno de TFA a lo largo del tiempo. Es decir, si muestran una recuperación del ya descrito efecto depresor que produce el EtOH sobre la locomoción en los nematodos (Davies y cols., 2015).

En este ensayo se utilizaron gusanos expuestos a Pb pertenecientes a las cepas N2 (*salvaje*) y RB2114 (mutante nula para la enzima ADH, ver más adelante), con el fin de evaluar el efecto que produce la exposición a Pb en etapas tempranas del desarrollo, sobre el fenómeno de tolerancia a los efectos locomotores de EtOH y la implicancia del metabolismo de dicha droga en estos efectos.

Al respecto, se ha mencionado previamente que la vía canónica del metabolismo del alcohol consta de dos pasos: el primero es la oxidación reversible del alcohol a su aldehído correspondiente por la enzima ADH, a la que sigue la oxidación del aldehído al ácido respectivo, reacción catalizada por la enzima ALDH. En animales superiores hay varias enzimas ADHs codificadas por diferentes genes, lo que determina la velocidad a la cual metabolizan el EtOH. En los seres humanos, por ejemplo, existen siete isoformas diferentes: ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4, ADH5, ADH6, y ADH7, siendo ADH1B la que predomina en la oxidación de EtOH y la que está asociada al mayor riesgo de alcoholismo (Edenberg & McClintick, 2018; Kubiak-Tomaszewska y cols., 2020). Los roedores producen solo cuatro diferentes ADHs activas, siendo la ADH1 la principal responsable del metabolismo de alcoholes comunes (Plapp y cols., 2015). En animales inferiores, particularmente en el pez cebra, el EtOH es metabolizado de una manera similar a los

humanos con dos genes diferentes que codifican para ADHs. La ADH1 tiene una K_m (concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de reacción) muy pequeña y metaboliza el EtOH a concentraciones más bajas. La ADH3 tiene una K_m mucho mayor y debido a su baja afinidad, contribuye al metabolismo del EtOH sólo cuando la concentración de éste aumenta. La curva en forma de U invertida de la actividad total de la ADH puede explicarse mediante el modelo de las dos ADH, que sugiere que el metabolismo del EtOH está regulado por ambas enzimas en función de la concentración de EtOH (Tran y cols., 2015). Si bien ADH es considerada una enzima no inducible en la mayoría de los organismos vivos (Kubiak-Tomaszewska y cols., 2020), en *C. elegans* se ha demostrado que el EtOH induce la expresión del gen *sodh-1* (Oh y cols., 2020) y que dicha expresión resulta necesaria para el primer paso del metabolismo del EtOH en *C. elegans* (Alaimo y cols., 2012; Williamson y cols., 1991). Este gen codifica para la síntesis de la enzima sorbitol deshidrogenasa, la cual es una proteína análoga de la enzima ADH en humanos, es decir que, si bien son codificadas por genes diferentes, la función que cumplen en cada especie es muy similar. Se infiere que la enzima sorbitol deshidrogenasa es la que participa en la oxidación del EtOH a ACD, ya que mostró regulación transcripcional en respuesta a un tratamiento prolongado con concentraciones altas de EtOH (Kwon y cols., 2004; Patananan y cols., 2015) y sus funciones en *C. elegans* han sido atribuidas como equivalentes a la enzima ADH (Alaimo y cols., 2012). Por otra parte, con respecto a la segunda enzima en el proceso de oxidación de EtOH (la enzima ALDH), se han descrito 19 genes en seres humanos, pero solo tres más relevantes para el metabolismo de ACD y estrechamente relacionados con una identidad de secuencia de aminoácidos del 68%: ALDH1A1, ALDH1B1 y ALDH2 (Edenberg & McClintick, 2018). Se ha reportado que *C. elegans* posee varios genes que codifican para ALDH (*alh*) (Alaimo y cols., 2012; Patananan y cols., 2015). Sin embargo, se desconocen las funciones específicas para muchos de ellos, aunque se postula que posiblemente presentan acciones redundantes (Artyukhin y cols., 2015). El escenario es más claro para la ADH, codificada por el gen *sodh-1*, que resulta necesaria para el primer paso del metabolismo del EtOH en *C. elegans* (Alaimo y cols., 2012; Williamson y cols., 1991) en el cual nos focalizaremos en los experimentos subsiguientes.

Materiales

- Placas plásticas de cultivo celular de 35 mm de diámetro conteniendo medio NGM
- Anillos de cobre de 10 mm de diámetro externo
- Etanol absoluto frío (Sintorgan)
- Acetaldehído (Sigma-Aldrich) 1mM disuelto en agua destilada
- Parafilm
- Cámara de fotos (Olympus, modelo SP-350)
- Lupa binocular (Nikon, modelo SMZ645)
- Ansa de platino

Procedimiento

Los grupos experimentales se conformaron de la siguiente forma:

- Grupo C no EtOH
- Grupo C EtOH
- Grupo Pb no EtOH
- Grupo Pb EtOH

Se destinaron 2 placas de 35mm a cada grupo: una sólo conteniendo agar NGM y otra placa conteniendo el mismo agar en la cual se depositó un anillo de cobre calentado en mechero, de manera que al contactar con el agar y fundirlo levemente quedó fijado en la superficie. Ninguna de las placas de ensayo fue sembrada con alimento. En el caso de los grupos EtOH, 2 horas antes del inicio del experimento, se agregó a la placa con el anillo de cobre una alícuota de EtOH absoluto y se sellaron las tapas con parafilm, de manera que al difundir en la totalidad del agar se obtuvo la concentración de la droga deseada (100, 200, o 400 mM). Posteriormente, gusanos en estadio L4 fueron levantados con ansa desde sus placas de origen de 10 cm conteniendo NGM y alimento, y colocados en las placas de cultivo con NGM sin alimento, con el objetivo de eliminar todo resto de bacteria. A los 30 minutos se reubicaron 10 de esos gusanos dentro del anillo de cobre de las segundas placas (con y sin EtOH) y se selló nuevamente la tapa con parafilm. La locomoción de estos organismos fue filmado a los 10 y 30 minutos posteriores con una cámara de fotos adosada a la lupa (ver figura 35).

Al finalizar los experimentos se analizó la trayectoria de cada uno de los organismos con el software Tracker (Open Source Physics ver. 4.9.8, 2017). Se determinó la variación en la velocidad (tomado como distancia recorrida en 2 minutos) de los gusanos en respuesta a EtOH frente a los animales no expuestos, tanto a los 10 como a los 30 minutos posteriores a la exposición a la droga.

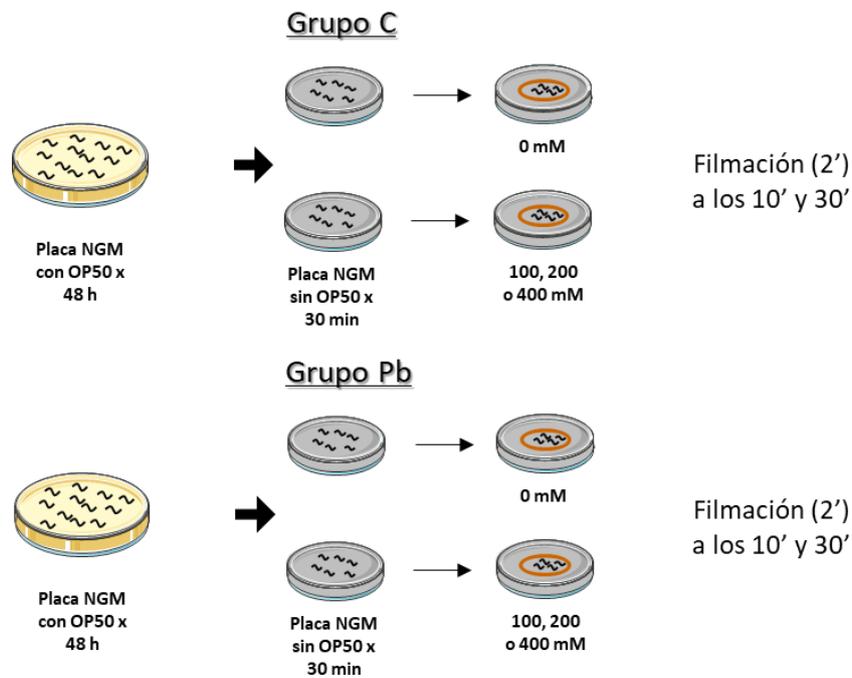


Figura 35. Esquema de exposición a EtOH empleado en el ensayo de actividad locomotora.

En relación a los experimentos con ACD, el análisis de los grupos ACD y ACD/ETOH, se realizó de manera similar a la ya descrita con algunas modificaciones. Los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera:

- Grupo C ACD
- Grupo C ACD/EtOH
- Grupo Pb ACD
- Grupo Pb ACD/EtOH

Al igual que en el experimento realizado con EtOH, se destinaron dos placas de cultivo de 35 mm con las mismas características, es decir, ambas con NGM sin alimento y una de ellas con el anillo de cobre posicionado en la superficie. En el caso de los grupos ACD, se colocaron 5 µl de ACD 1mM en la placa con el anillo en las 2 horas previas a su filmación, mientras que en las placas de los grupos ACD/EtOH se colocó esta concentración de ACD junto con el EtOH necesario para conseguir una concentración

final de 200 mM como en el experimento anterior. Se realizó el test en condiciones experimentales idénticas a las mencionadas previamente.

Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un ANOVA de dos vías, contrastando las variables grupo (C vs Pb) y droga (EtOH vs No EtOH), en dos análisis separados para los 10 y 30 minutos post exposición a EtOH. A continuación, y a los fines de facilitar la visualización, se analizó el comportamiento del grupo C y Pb en función del tiempo de exposición (ANOVA de dos vías de muestra repetidas), refiriendo los datos al promedio de su respectivo grupo no expuesto a EtOH. Cuando los ANOVAs arrojaron interacciones entre las variables, se realizó el test de Tukey como prueba post hoc, cuyo resultado se denota en los símbolos de las figuras correspondientes. Finalmente, en el cálculo de porcentaje de recuperación de la conducta de sedación a lo largo del tiempo se aplicó el test de Student para muestras independientes. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico *Statistica 10* y graficados con el programa *GraphPad Prism 8*.

Determinación de alcohol en el agar

En este ensayo se determinó la concentración de EtOH en las placas de ensayo, con el objetivo de determinar si la concentración alcanzada se correlacionaba con el cálculo teórico precisado.

Materiales:

- Placas plásticas de cultivo celular de 35 mm de diámetro conteniendo medio NGM
- Etanol absoluto frío (Sintorgan)
- Parafilm
- Agua destilada fría
- Hielo
- Equipo Roche Cobas 6000, método enzimático para determinación de etanol (sensibilidad: 10 mg/dL).

Procedimiento:

Se realizó el ensayo en 3 grupos experimentales diferentes, los cuales fueron:

- EtOH, 0 mM
- EtOH, 200 mM
- EtOH, 400 mM

Se pesaron las placas vacías y luego se colocó aproximadamente 3 ml de agar NGM en cada una. Se calculó la diferencia de peso entre la placa vacía y la placa con agar. Posteriormente, se colocó la cantidad necesaria de EtOH frío de modo tal de conseguir una concentración final de 200 y 400 mM por placa y se sellaron las tapas con parafilm. En el caso del grupo EtOH 0 mM, se agregó sólo agua destilada. Luego de 2 horas de reposo, tiempo estimado para permitir que el EtOH se equilibre con el medio NGM, se realizaron varias perforaciones en cada placa y se homogeneizó cada fracción de agar en tubos con agua destilada fría, para evitar evaporación del EtOH, a razón de 1:3 (agar/agua destilada). Dichas muestras fueron luego analizadas por el equipo Equipo Roche Cobas 6000 método enzimático y se calculó la cantidad de agar en la placa original en función de los datos arrojados por el equipo. Este experimento se realizó por triplicado.

Resultados:

Como se puede observar en la figura 36, la concentración real de EtOH en distintos puntos de la placa de exposición mostró coincidencia con la concentración teórica calculada tanto a 200 mM como a 400 mM de EtOH, que fueron las primeras concentraciones en ser evaluadas en los experimentos. El valor obtenido en la placa sin EtOH (0 mM), puede explicarse por la composición del agar NGM, que contiene colesterol disuelto en EtOH (5 mg/ml EtOH). No obstante, este valor representa una cantidad insignificante e insuficiente para modificar la conducta de los gusanos sin el agregado adicional de la droga.

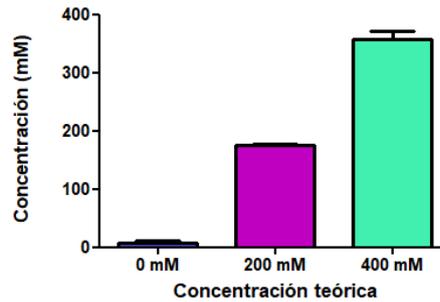


Figura 36. Comparación entre la concentración real de EtOH en el medio de ensayo frente a la teórica obtenida por cálculo matemático.

Resultados

Respuesta de gusanos de la cepa N2 frente a distintas concentraciones de EtOH

- Gusanos N2 frente a 400 mM de EtOH

Como puede observarse en la figura 37, se registró la velocidad de alrededor de 10 gusanos de cada grupo (C y Pb) en condiciones de EtOH y sin EtOH en la placa de Petri. La respuesta observada a los 10 minutos de exposición (figura 37 A) se traduce en una disminución de la velocidad en los gusanos expuestos a EtOH, tanto el grupo C como el grupo Pb, comparados con su respectiva condición sin EtOH. Esto es avalado por el análisis estadístico, que demuestra un efecto en la variable droga ($F [1,26] = 7,04$; p valor $< 0,05$). Al cabo de 30 minutos, esta tendencia varió sólo en el grupo Pb, donde los nematodos expuestos a EtOH superaron levemente la velocidad que evidenció el grupo no expuesto a la droga, aunque esta variación no fue estadísticamente diferente (figura 37 B). El análisis de la conducta como una normalización sobre la base del movimiento de los gusanos no expuestos (figura 38 A), revela que en el grupo C el efecto de sedación se mantiene a lo largo de toda la prueba sin lograr una completa recuperación de su movilidad, es decir sin desarrollar TFA (figura 38 B). No obstante, en el caso del grupo Pb, se observa una sedación inicial a los 10 minutos que no sólo se revierte a los 30 minutos, sino que supera la actividad de los gusanos que no fueron expuestos a EtOH, lo que se podría interpretar como una tolerancia al efecto sedativo de la droga (figura 38 A). Al respecto, el análisis estadístico (ANOVA de dos vías, variables grupo x tiempo) reveló una diferencia significativa en la variable tiempo ($F [1,13] = 7,15$; p valor $< 0,05$). En cuanto a la recuperación de la locomoción (figura 38 B), al cabo de los 30 minutos el

grupo expuesto al Pb recuperó el 48% de su movilidad inicial, comparado con el grupo C que sólo recobró un 23% de su movilidad inicial, aunque estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas.

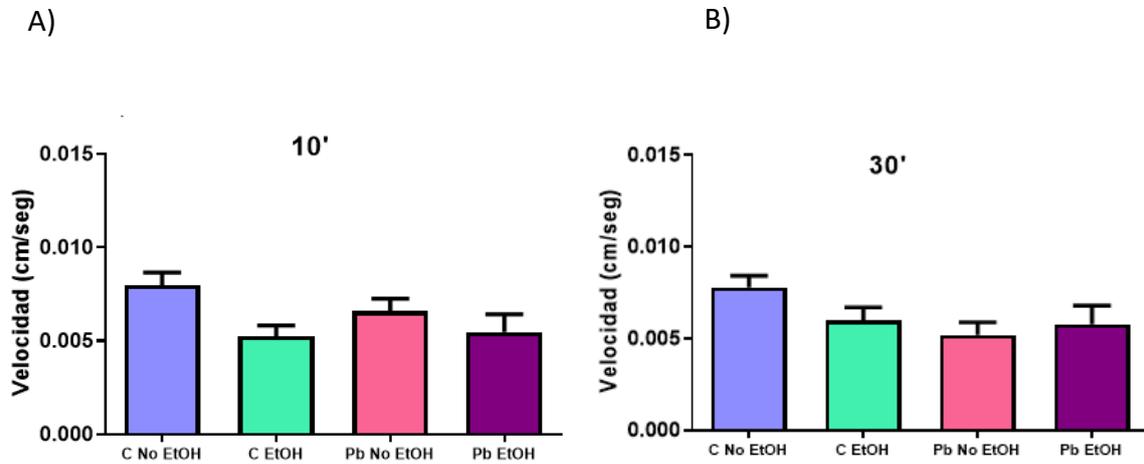


Figura 37. Respuesta locomotora a 400 mM de EtOH en gusanos N2 a los 10 (A) y 30 (B) minutos posteriores a la exposición a la droga.

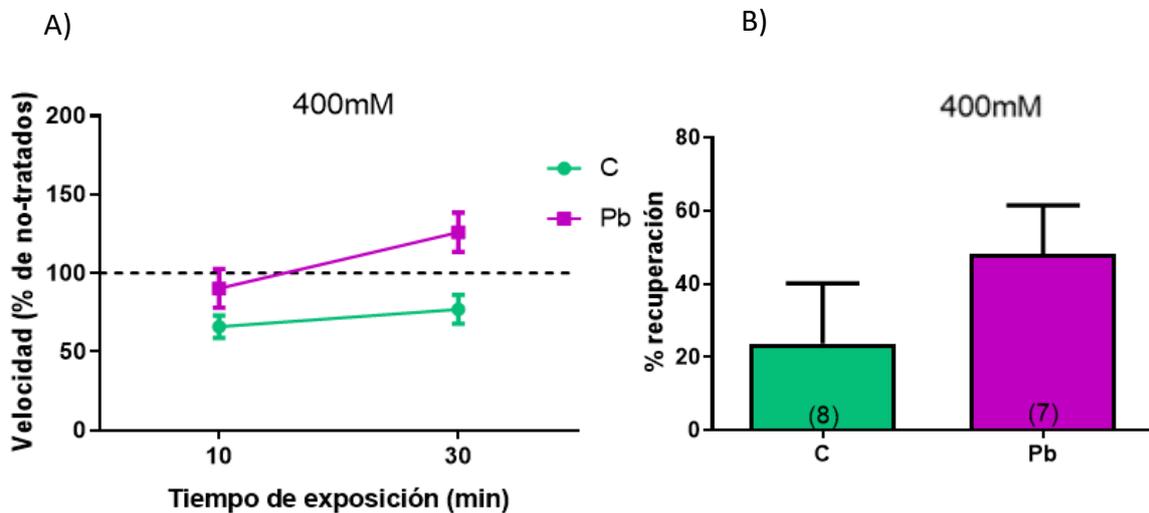


Figura 38. (A) Respuesta locomotora a 400 mM de EtOH en gusanos expuestos respecto de los no expuestos a la droga. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH. Entre paréntesis se expresa el N empleado en cada ensayo.

- *Gusanos N2 frente a 200 mM de etanol*

Teniendo en cuenta los efectos sedativos de una concentración de 400 mM de EtOH (Davies y cols., 2003) y considerando las propiedades bifásicas que presenta esta droga en función de la dosis empleada (Hendler y cols., 2013; Pohorecky, 1977), se decidió evaluar los efectos de una dosis menor de la droga, con el objetivo de evidenciar las propiedades estimulantes que deberían presentarse a menores concentraciones. En este caso, como puede observarse en la figura 39, tanto a los 10 como a los 30 minutos los gusanos C tendieron a disminuir su velocidad luego del agregado de EtOH. Por el contrario, los gusanos Pb mostraron el efecto opuesto, es decir, los nematodos presentes en la placa con EtOH evidenciaron mayor velocidad de locomoción que aquellos que no fueron expuestos a la droga. El análisis estadístico revela una diferencia significativa sólo en la variable grupo ($F [1,21] = 8,63$; p valor $< 0,01$). Al igual que con 400 mM, el grupo C tampoco mostró el desarrollo de tolerancia ni recuperación al cabo de los 30 minutos de exposición (figura 40 A y B). En el caso del grupo Pb, el efecto se evidencia con mayor claridad en la figura 40 A, donde se puede observar que estos animales no sólo desarrollaron tolerancia, sino que aumentaron su movilidad luego de 30 minutos de exposición a la droga. Más aun, demostraron una mayor recuperación a lo largo del tiempo, en relación al grupo C (figura 40 B). El ANOVA de dos vías para la figura 40 reveló diferencias estadísticamente significativas en la variable grupo ($F [1,11] = 13,07$; p valor $< 0,01$), tiempo ($F [1,11] = 6,20$; p valor $< 0,05$) y en la interacción grupo x tiempo ($F [1,11] = 6,59$; p valor $< 0,05$). Por otra parte, la recuperación entre los grupos C y Pb (figura 40 B) también fue estadísticamente diferente (Test de Student, $t = 3,10$; p valor $< 0,05$).

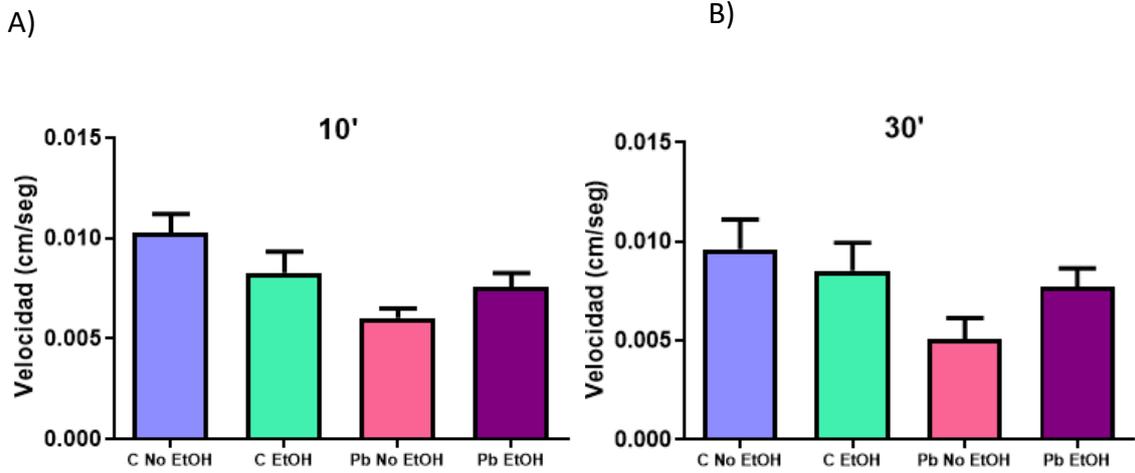


Figura 39. Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH en gusanos N2 a los 10 y 30 minutos posteriores a la exposición a la droga.

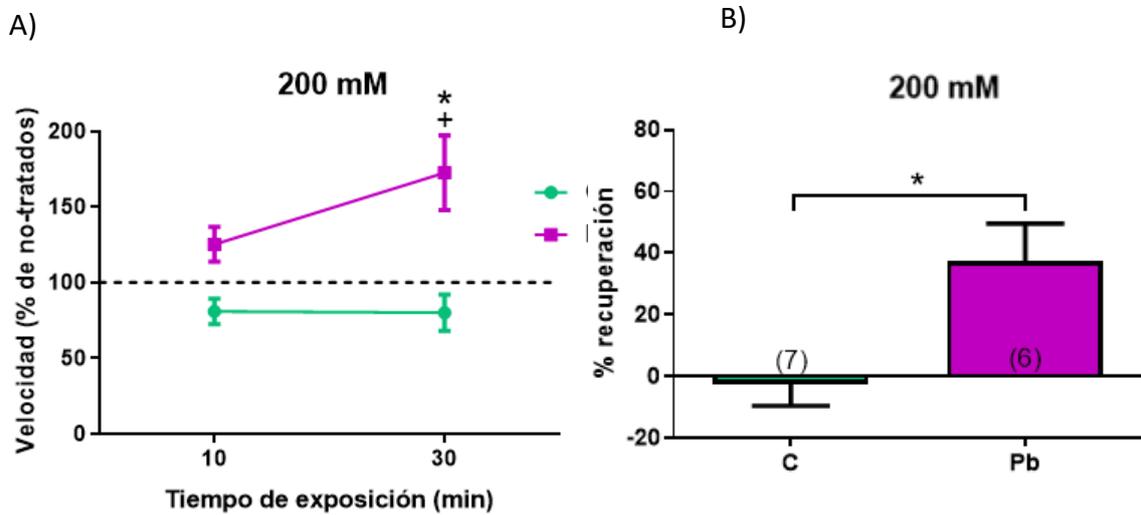


Figura 40. (A) Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH en gusanos expuestos respecto de los no expuestos a la droga, donde + representa una diferencia entre Pb 10' vs Pb 30', $p < 0,05$. * indica diferencia significativa entre Pb 30' vs C 30' con $p < 0,05$. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH. *indica diferencia significativa C vs Pb, $p < 0,05$.

- *Gusanos N2 frente a 100 mM de etanol*

Puesto que a 200 mM de EtOH se evidenciaron diferencias significativas entre ambos grupos en la sensibilización inicial y en la TFA a la droga, se buscó evaluar si dosis aun menores potenciarían la manifestación de este efecto bifásico y diferencial en ambos grupos frente a la droga. Como puede observarse en la figura 41 A y B, la velocidad de todos los grupos de nematodos fue similar en todas las condiciones experimentales. La figura 42 A demuestra que la dosis empleada no provocó sedación ni desarrollo de tolerancia en ningún grupo a lo largo del tiempo, así como tampoco hubo cambios estadísticamente significativos en la recuperación (figura 42 B).

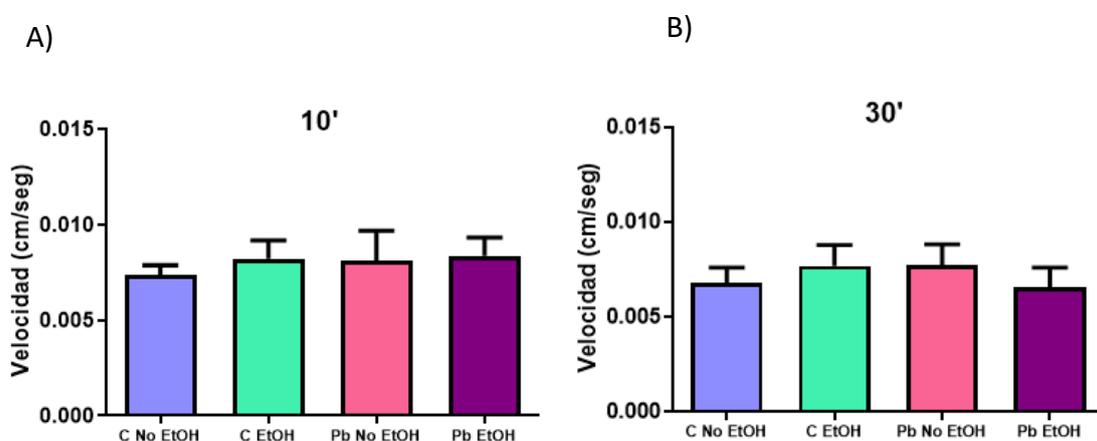


Figura 41. Respuesta locomotora a 100 mM de EtOH en gusanos N2 a los 10 (A) y 30 (B) minutos posteriores a la exposición a la droga.

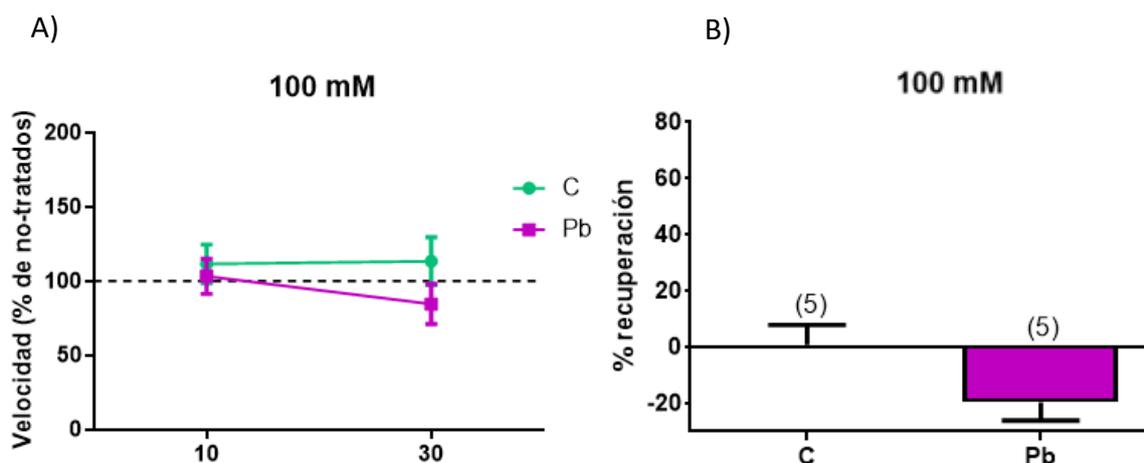


Figura 42. (A) Respuesta locomotora a 100 mM de EtOH en gusanos expuestos respecto de los no expuestos a la droga. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH.

Respuesta de gusanos de la cepa RB2114 frente a 200 mM de etanol

Se empleó la cepa RB2114 la cual, como se mencionó anteriormente, no posee la enzima con capacidad de ADH (*sodh-1* en *C. elegans*) por lo tanto no metabolizaría completamente el EtOH presente en el organismo. Siguiendo el diseño de los experimentos previos, se registró la respuesta locomotora frente a 200 mM de EtOH en esta cepa de nematodo.

Los resultados demuestran (figura 43) que los gusanos de todos los grupos evidenciaron velocidades de locomoción muy similares independientemente de la exposición a EtOH a los 10 minutos de exposición (figura 43 A), en tanto que a los 30 minutos (figura 43 B) se observó una disminución en los grupos que fueron expuestos a EtOH, resultando en una significancia estadística para la variable grupo ($F [1,24] = 10,36$; p valor $< 0,01$). Este comportamiento se ha graficado en la figura 44 (A) como el porcentaje de la velocidad en función de los animales no tratados con EtOH. Puede observarse que los gusanos de ambos grupos disminuyeron su tasa de movimiento a lo largo del tiempo, e incluso no generando TFA, dado que no sólo no recuperaron el movimiento a medida que transcurrió el tiempo, sino que éste mostró una reducción no significativa desde el inicio de la exposición a EtOH (figura 44 B).

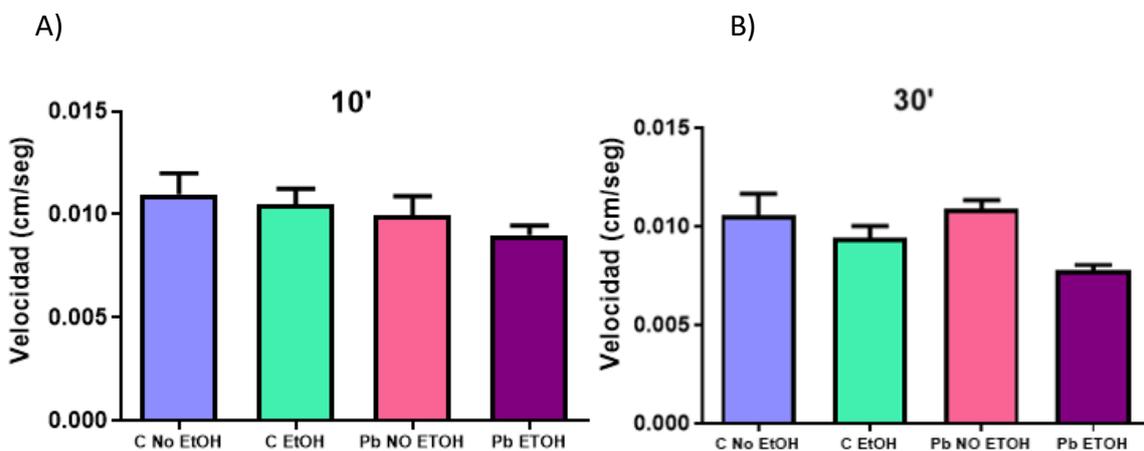


Figura 43. Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH en gusanos mutantes nulos para *sodh-1* a los 10 (A) y 30 (B) minutos posteriores a la exposición a la droga.

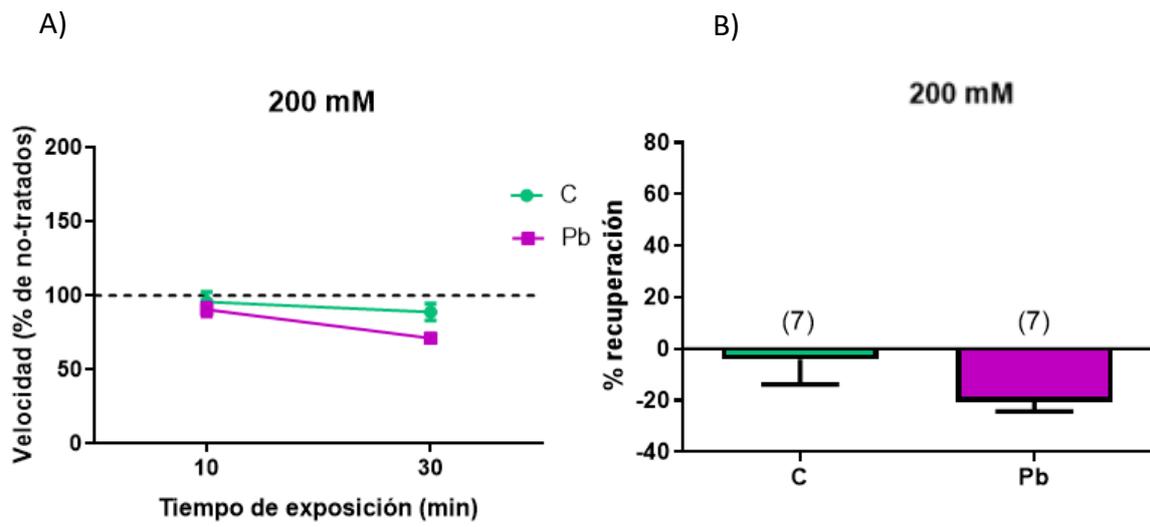


Figura 44. (A) Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH en gusanos RB2114 expuestos respecto de los no expuestos a la droga. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH.

Respuesta de gusanos de la cepa N2 frente a 200 mM de etanol y/o 1mM de ACD

A partir de los resultados obtenidos con la cepa RB2114, se pudo evidenciar que la falta de la enzima que metaboliza el EtOH a su primer metabolito impide la generación del fenómeno de TFA en ambos grupos. Esto podría deberse a un efecto de acumulación de EtOH, o por el contrario a la ausencia de la generación de ACD, primer producto de la metabolización de la droga.

A los fines de indagar sobre la segunda de estas posibilidades, se realizó, en primer lugar, el ensayo de actividad locomotora en respuesta a EtOH en la cepa N2, en presencia de 1 mM de ACD.

Como puede observarse en la figura 45 (A), la presencia concomitante de EtOH + ACD en el medio generó una TFA en el grupo Pb ($F [1,14] = 6,06$; p valor $< 0,05$), mientras que los animales C manifestaron una sedación mayor a los 30 minutos que a los 10 minutos de exposición. Esta aseveración se basa en la interacción grupo x tiempo, ($F [1,14] = 6,27$; p valor $< 0,05$) evidenciada en el ANOVA de dos vías, a pesar que el test de Tukey no arrojó diferencias significativas entre las variables. Sin embargo, en la figura 45 (B) se evidencia una diferencia significativa en el porcentaje de recuperación, es decir que los gusanos expuestos a Pb recuperaron su movilidad en relación a los gusanos C, en los cuales esta conducta se vio empeorada (Test de Student, $t = 2,65$; p valor $< 0,05$).

Por otro lado, como se puede observar en la figura 46, el ACD solo, sin el agregado de EtOH, no modifica la movilidad de los gusanos, dado que tanto en presencia como ausencia de ACD, la actividad locomotora se produjo a igual velocidad (figura 46 A), tanto a los 10 como a los 30 minutos. Esta aseveración puede corroborarse en la figura 46 (B), en la que los gusanos muestran porcentajes de recuperación cercanos al 0%.

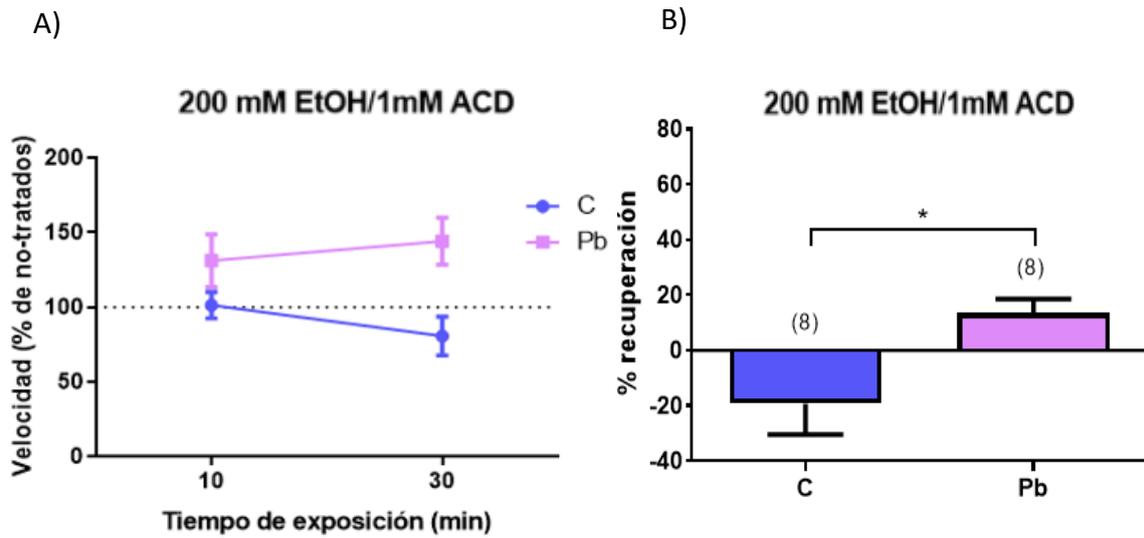


Figura 45. (A) Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH y 1 mM de ACD en gusanos N2 expuestos respecto de los no expuestos a dichas sustancias. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH + ACD, donde * representa diferencia entre C vs Pb, $p < 0,05$.

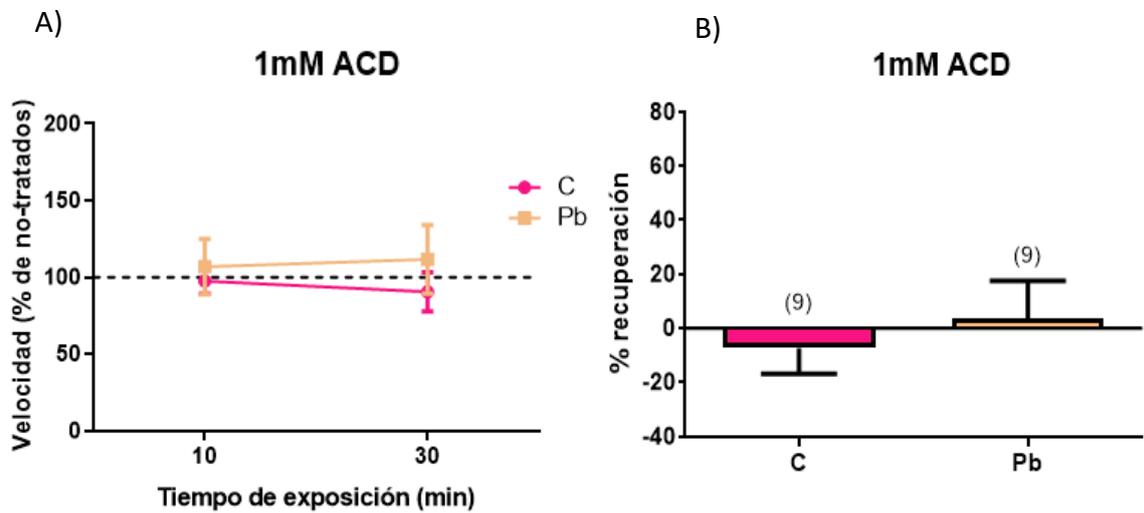


Figura 46. (A) Respuesta locomotora a 1 mM de ACD en gusanos N2 expuestos respecto de los no expuestos a dicha sustancia. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a ACD.

Respuesta de gusanos de la cepa RB2114 frente a 200 mM de etanol y 1mM de ACD

Otro aspecto que fue abordado en este estudio fue la evaluación de la conducta de los gusanos de la cepa RB2114 en presencia de ACD en condiciones similares a las del experimento anterior. Dicho ensayo responde a la característica de esta cepa basada en la imposibilidad de metabolizar al EtOH, debido a la ausencia de la enzima que cataliza su metabolismo a ACD.

Los resultados demuestran que la presencia concomitante de 1mM de ACD y 200mM de EtOH indujo idéntico comportamiento en ambos grupos de gusanos (C y Pb) (figura 47 A), tanto en la velocidad de locomoción como en el porcentaje de recuperación (figura 47 B). Puede observarse en este caso una tendencia del ACD a generar un efecto de tolerancia, pero los resultados no presentan significancia estadística entre ambos grupos a los 30 minutos de exposición.

En cuanto al ACD por sí solo (figura 48 A y B), los resultados indican que no se produjo un efecto significativo en la velocidad de locomoción, ni en los animales C ni en los expuestos a Pb. A pesar que en el grupo Pb se observa un cambio en el comportamiento tendiente a generar tolerancia, éste no fue estadísticamente significativo.

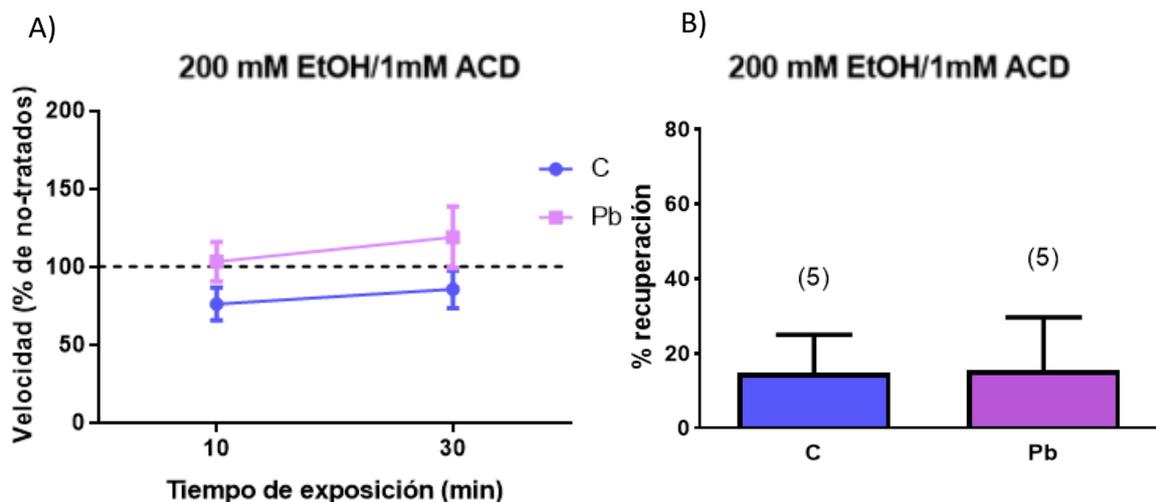


Figura 47. (A) Respuesta locomotora a 200 mM de EtOH y 1 mM de ACD en gusanos RB2114 expuestos respecto de los no expuestos a dichas sustancias. (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición a EtOH + ACD.

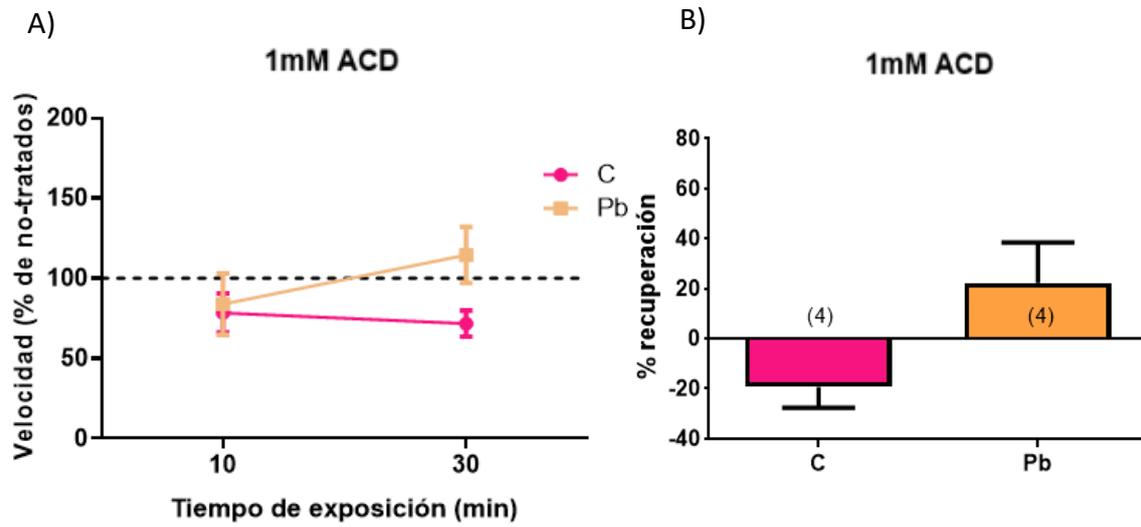


Figura 48. (A) Respuesta locomotora a 1 mM de ACD en gusanos RB2114 expuestos o no expuestos a dicha sustancia (A). (B) Nivel de recuperación de la movilidad en la actividad locomotora a los 30 minutos posteriores a la exposición de ACD.

Respuesta a la exposición a alcohol alílico

Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, la enzima ADH es la responsable del proceso de oxidación de EtOH a ACD, con la consecuente reducción de NAD⁺. En organismos superiores, ADH participa en la metabolización a nivel periférico del EtOH pero no así a nivel central, ya que se ha demostrado que está presente en cantidades insignificantes en cerebro y este paso es catalizado principalmente por la enzima CAT (Sippel, 1974; Smith y cols., 1997; Zimatkin, 1991). No obstante, en el invertebrado *C. elegans* no se ha descrito que la enzima CAT participe en el metabolismo de EtOH, por lo que puede inferirse que esta sustancia es metabolizada en su totalidad por ADH para producir ACD, el cual en última instancia es oxidado a ácido acético por la enzima ALDH. La presencia de ADH ha sido fundamental para estudiar el metabolismo y la regulación de los genes implicados en la respuesta a EtOH en *C. elegans*. A este respecto, Williamson y cols describieron un método para seleccionar nematodos mutantes con expresión disminuida o falta de actividad de ADH y la frecuencia de mutación de esta enzima. Para esto se valieron del uso de alcohol alílico, un compuesto que genera un metabolito tóxico, la acroleína, cuya formación permite seleccionar organismos que no expresan la enzima, ya que son los que sobreviven a este tratamiento (Williamson y cols., 1991).

En base a los resultados presentados en la sección anterior, resulta de interés abordar el estudio de la funcionalidad de la enzima ADH a fin de inferir su actividad tanto en los nematodos *C* como en los expuestos a Pb durante el desarrollo. Se utilizaron gusanos de las cepas N2 y RB2114, esta última como control positivo del comportamiento bajo estudio.

Materiales

- Placas de cultivo celular 35mm estériles con tapa
- Medio NGM
- Alcohol alílico (Sigma-Aldrich)
- Parafilm
- Bacteria *E. coli OP50* concentrada

- Tubos falcon de 15 ml estériles con tapa

Procedimiento

Se prepararon por duplicado placas con NGM y una dosis de alcohol alílico en función de la concentración final deseada de esa sustancia en el agar (ver figura 49). Las dosis empleadas fueron: 0,005%, 0,01%; 0,05% y 0,1% v/v de alcohol alílico. A tal fin, se colocaron 14 ml de agar NGM fundido en tubos falcon y se agregó 1,4 μ l, 7 μ l y 14 μ l de alcohol alílico puro para 0,01%; 0,05% y 0,1%, respectivamente. Se procedió a plaquear con 3 ml de agar por placa. En el caso 0,005% se agregó 1,4 μ l de una solución de alcohol alílico al 50% en agua para evitar pipetear un volumen tan pequeño. Se dejaron solidificar y secar con tapa sellada con parafilm hasta el día siguiente, momento en el que se agregó 25 μ l de bacteria concentrada en el centro de cada placa. A las 24 h, se colocaron entre 20 y 30 gusanos de cada grupo por placa, se sellaron las tapas nuevamente con parafilm y se mantuvieron por 48 h a 20°C en incubadora. Finalmente se contaron bajo lupa la cantidad de gusanos vivos y muertos en cada placa, y se realizó un promedio de las observaciones para cada dosis por grupo.

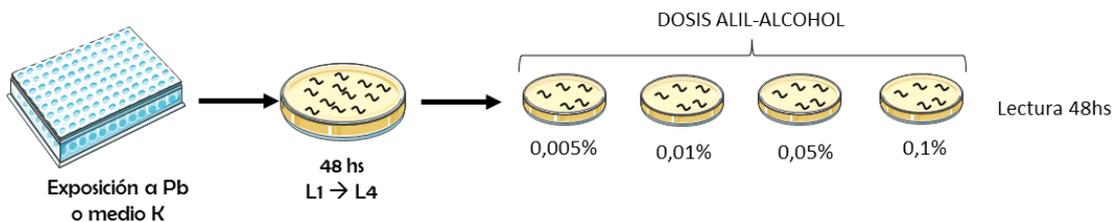


Figura 49. Esquema experimental empleado en el ensayo de exposición a alcohol alílico.

Resultados

El conteo de gusanos RB2114 que sobrevivieron al cabo de 48 hs de la exposición a alcohol alílico, confirmó la mutación de la cepa, ya que ambos grupos (tanto C como Pb), presentaron valores cercanos al 100% de supervivencia, es decir que al no poseer la enzima que metaboliza el alcohol alílico, no se formó el metabolito tóxico, por lo tanto, prácticamente todos los gusanos sobrevivieron al tratamiento (figura 50). Por el contrario, en el caso de los nematodos de la cepa N2, la supervivencia que se logró en ambos grupos a las dosis más bajas de este compuesto fue similar y prácticamente completa en la población estudiada, posiblemente como resultado de la escasa cantidad de alcohol alílico en esa placa, insuficiente para generar el metabolito tóxico (figura 51). Sin embargo, a dosis mayores emergieron las diferencias entre grupos, siendo la dosis de 0,05% de alcohol alílico la que generó un cambio estadísticamente significativo en los grupos (Test de Student, $t= 3,10$; p valor $< 0,01$) con valores para los animales pertenecientes al grupo C = $6,746 \pm 2,597$ ($n=7$) y para el grupo expuesto a Pb = $29,60 \pm 6,474$ ($n=8$). A la dosis de 0,1% de alcohol alílico, el nivel de supervivencia fue muy bajo en ambos grupos, posiblemente debido a que la cantidad de acroleína que se forma provoca la muerte de la mayoría de la población, independientemente del grupo al que pertenecen. A partir de estos resultados podría proponerse que los gusanos N2 expuestos a Pb presentarían una enzima ADH con una menor actividad catalítica en comparación con los C. Así, la exposición temprana a Pb induciría una menor actividad de ADH, generando menos acroleína, y por consiguiente un mayor índice de supervivencia. Este efecto determinaría que, frente a la presencia de EtOH, se genere una mayor concentración de esta droga con respecto a los animales C, la cual sería responsable de un mayor efecto estimulante, tal como se pudo evidenciar en la prueba de actividad locomotora de gusanos N2 frente a 200mM de EtOH (ver figura 40 A).

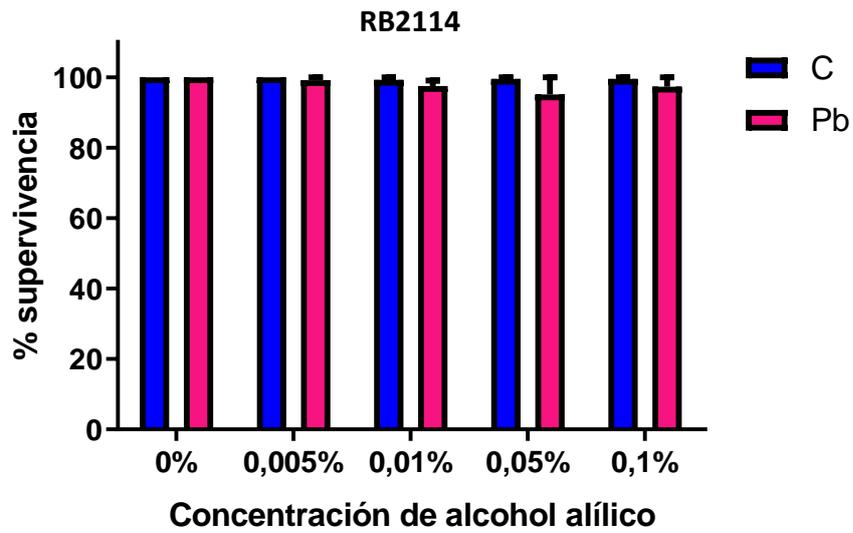


Figura 50. Ensayo de supervivencia a alcohol alílico en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa RB2114.

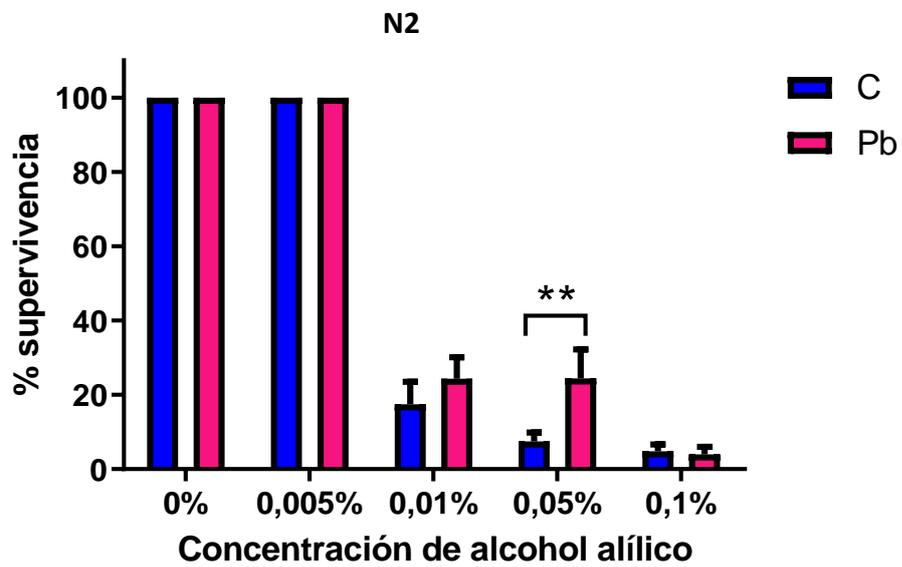


Figura 51. Ensayo de supervivencia a alcohol alílico en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa N2, donde ** representa diferencia significativa de Pb vs C en la dosis 0,05%, $p < 0,01$

Discusión

Es conocido que el EtOH presenta efectos subletales incluso a una concentración muy baja que podrían no observarse con puntos finales menos sensibles, como la letalidad. Al respecto, se ha reportado un LOAEL (menor nivel de efecto adverso observado, por sus siglas en inglés, *lowest observed adverse effect level*) en gusanos de 0,8 g/L de EtOH (21 mM) (Dhawan y cols., 1999). Estos efectos subletales podrían manifestarse frente a la toxicidad generada por otras sustancias químicas. En base a estas consideraciones, la administración de Pb durante el desarrollo del gusano podría representar un estímulo suficiente como para que se pongan en evidencia efectos como los buscados en este trabajo de tesis, es decir evaluar el impacto de una noxa perinatal (Pb en nuestro caso) sobre los efectos de otros neurotóxicos en etapas posteriores de la vida. Es así que el ensayo de locomoción puso de manifiesto que gusanos expuestos a dosis altas de EtOH (400 mM) desarrollaron una sedación a los 10 minutos post exposición, donde sólo el grupo Pb logró recuperar parte de esa movilidad, aunque no de manera significativa respecto a los animales C (figura 38). Estos resultados concuerdan con los reportes ya mencionados que demuestran que el EtOH a dosis elevadas produce sedación en estos organismos (Alaimo y cols., 2012; Davies y cols., 2015; P. H. Mitchell y cols., 2007). A este respecto, al evaluar la respuesta de los animales frente a la exposición a 200 mM de EtOH, se pudo observar que emergieron las diferencias entre los grupos. Los gusanos expuestos a Pb mostraron una mayor velocidad de locomoción desde los 10 minutos posteriores a la exposición a la droga, la que se acentuó al cabo de 30 minutos, evidenciándose el fenómeno de TFA, efecto que no se manifestó en los gusanos C (figura 40). Interesantemente, la hiperactividad inducida por EtOH en animales expuestos a Pb durante el desarrollo es un fenómeno comportamental que ya ha sido descrito por nosotros en un modelo de roedores con condiciones de exposición comparables al descrito en este trabajo de tesis. Al respecto, en Mattalloni y cols reportamos que ratas Wistar de 35 días de edad, expuestas a dosis ambientalmente relevantes de Pb durante la etapa perinatal, consumieron más alcohol que sus respectivos controles y presentaron mayor actividad locomotora luego de la sesión de consumo voluntario de EtOH (Mattalloni y cols., 2013, 2017). Así, si bien el diseño experimental y el modelo animal utilizado en estos estudios es diferente, en

ambos casos observamos una aumentada locomoción en respuesta al EtOH resultante de la exposición a Pb durante el desarrollo, lo que evidencia la posibilidad de trasladar respuestas comportamentales de un modelo a otro y permite estudiar mecanismos de toxicidad que podrían ser comparables con los observados en mamíferos.

Dado que las enzimas primarias responsables del metabolismo de EtOH (y por lo tanto sus metabolitos) están presentes en *C. elegans* y son funcionalmente similares a las de los mamíferos, es probable que el metabolismo de EtOH ocurra de manera similar en esta especie, aun cuando no es posible en gusanos compartimentalizar este metabolismo.

Con el fin de profundizar sobre el efecto que estaría produciendo la exposición a Pb en la actividad de ADH, se replicó el test de actividad locomotora en cepas que carecen de esta enzima (RB2114: *-/-sodh-1*). En estas condiciones experimentales los gusanos de ambos grupos mostraron una sedación en la actividad locomotora tanto a los 10 como a los 30 minutos de exposición y no desarrollaron el fenómeno de TFA. La acumulación de EtOH observada en los animales mutantes fue suficiente para alterar su comportamiento y producir sedación ante la exposición de dicha sustancia. En concordancia con los reportes de Alaimo y cols, la mutación del gen que codifica para ADH (*sodh-1*) causó hipersensibilidad a los efectos sedativos agudos del EtOH en la locomoción, probablemente debido al incremento de la concentración interna de EtOH en estos animales (Alaimo y cols., 2012). Estos autores reportaron también que la osmolaridad de la solución de EtOH exógeno afectó fuertemente la sensibilidad a los efectos depresivos de la droga, lo cual indicaría que la concentración de la solución no es el único factor que podría estar condicionando esta respuesta. Del mismo modo se han reportado diferencias en los mecanismos que median los efectos frente a EtOH en función del medio de exposición (medio líquido vs. semisólido-agar) (Mitchell y cols., 2007).

En relación al hecho de que los animales salvajes expuestos a Pb desarrollan TFA a los 30 minutos frente a una exposición de 200 mM de EtOH, podría atribuirse al proceso de metabolización natural de la droga por las vías enzimáticas mencionadas anteriormente. Esto está sustentado por el reporte reciente que demuestra que los genes inducidos por exposiciones cortas a esta droga son principalmente los de las enzimas involucradas en el metabolismo de EtOH (Sterken y cols., 2021). Sin embargo,

existen evidencias que indican que la metabolización de esta sustancia es lenta y sostenida, y que las concentraciones tisulares de EtOH no disminuyen sustancialmente durante una única exposición constante (Davies & McIntire, 2004). Por lo tanto, estos autores sugieren que la respuesta de tolerancia se debería a un proceso de plasticidad neuronal y adaptación al medio, es decir un efecto a nivel de sistema nervioso, más que a un efecto metabólico relacionado con la desaparición de la droga. En relación a esta posibilidad, una explicación viable a los efectos centrales del EtOH podría estar relacionada con la activación de BK, el canal de K activado por Ca y voltaje también llamado SLO-1 (*slo-1* codifica la subunidad formadora de poros de dicho canal) que, como se dijo anteriormente, actúa amortiguando la actividad de las células neuronales puesto que limitaría la liberación de neurotransmisores excitatorios. La potenciación por el EtOH, por tanto, disminuiría la actividad neuronal, dando lugar a los efectos depresivos de la intoxicación con esta droga (Wu y cols., 2019). Interesantemente, el canal BK ha sido señalado como una de las bases moleculares involucradas en el inicio de la tolerancia funcional a EtOH, al menos en invertebrados (Pietrzykowski & Treisman, 2008).

Así, a pesar de los reportes contradictorios y que las evidencias presentadas indicarían que el metabolismo de EtOH podría ser un factor secundario en los efectos sobre la locomoción resultante de la exposición a la droga, resultó de interés evaluar si los efectos observados en los gusanos Pb estarían relacionados con la acumulación de EtOH o en contraparte con una ausencia de la producción de ACD. Interesantemente, se ha señalado que en *C. elegans* la acción de la ADH (a diferencia de ALDH) es reversible (Alaimo y cols, 2012) por lo que en determinadas situaciones el posible exceso de ACD en estos animales podría convertirse nuevamente en EtOH, aumentando así la concentración interna de esta droga. Este hecho, sumado a la hipótesis de una hipofunción de ADH, apoya la idea de que en los efectos del EtOH sobre los animales expuestos a Pb predominaría la acumulación de EtOH, por sobre la disminución de ACD. Cabe recordar que, como se mencionó en la introducción, el ACD presenta en animales superiores efectos opuestos que guardan directa relación con el órgano en el cual se produce. Es así que cuando es generado *in situ* en el cerebro está asociado a efectos estimulantes y recompensantes, en tanto que cuando su formación ocurre en la periferia del organismo predominan los efectos aversivos resultantes de su

acumulación. A este respecto, los resultados en roedores mencionados en la Introducción revelan la importancia del primer metabolito de EtOH en sus propiedades estimulantes y motivacionales en animales expuestos al Pb, apoyando el postulado de que la farmacocinética del metabolismo de EtOH influencia el riesgo de desarrollar un AUD. Las enzimas ADH y ALDH juegan un rol clave no sólo en los niveles de ACD producido y el consumo de EtOH, sino también en la vulnerabilidad a desarrollar AUD. Es de interés destacar que varios genes asociados al metabolismo del EtOH pueden estar sobreexpresados frente a una exposición a dicha droga. Se ha reportado que en el análisis de ARN-seq en *C. elegans* expuestos a 17 mM de EtOH durante 4 días, el gen *sodh-1* fue sobreexpresado 103 veces, mientras que *alh-1*, *alh-2* y *alh-5* aproximadamente 5, 64 y 4 veces, respectivamente (Patananan y cols., 2015). Sin embargo, y a pesar que esta compartimentalización no está presente en *C. elegans*, resultó de interés evaluar la participación del ACD en la tolerancia al EtOH en este organismo. Resultados obtenidos por Gainutdinov y cols. demostraron que el aumento de la concentración endógena de ACD mediante la inhibición farmacológica de la actividad de la enzima ALDH atenuó fuertemente las alteraciones inducidas por el EtOH en la locomoción de los gusanos. Asimismo, reportaron que bajas concentraciones de ACD (entre 0,6 a 1,6 mM) protegieron contra el efecto sedativo del EtOH sobre la locomoción en *C. elegans* (Gainutdinov y cols., 2009).

En base a estas evidencias, en este trabajo de tesis, realizamos la prueba de locomoción tanto en la cepa salvaje como la mutante nula para ADH con el agregado de ACD en una concentración final de 1 mM, valor que no produce efectos adversos en el nematodo como ocurre a dosis superiores (entre 2 y 20 mM) (Gainutdinov y cols., 2009; Kalinnikova y cols., 2012). Como se puede visualizar en las figuras 45 y 46 (cepa salvaje) y 47 y 48 (cepa nula para ADH), la adición de ACD, ya sea sólo o en concomitancia con EtOH, no modificó la conducta que ya se había observado previamente en presencia de EtOH en ambas cepas. La ausencia de la recuperación de la sedación observada en la cepa RB2114, se explicaría a partir de un exceso de EtOH, generándose así el efecto sedativo de esta droga que se presenta sostenido en el tiempo. Esta conclusión se basa en la ausencia de ADH en estos animales, lo que impediría la formación de ACD y favorecería la acumulación de EtOH.

Así, a los fines de evaluar la funcionalidad de ADH, se adaptó el protocolo descrito por Williamson y cols. (1991) en la prueba de formación del metabolito tóxico acroleína a partir de alcohol alílico. Se concluyó que los gusanos expuestos a Pb presentarían una ADH hipofuncional, lo que provocaría una ralentización en la metabolización, con la consecuente acumulación de EtOH y probablemente la prolongación de la fase estimulante dentro de los efectos bifásicos de esta droga (figura 51). Ha sido descrito que ADH sufre un cambio conformacional global al unirse NAD^+ , que involucra una rotación del dominio catalítico relativo al dominio de unión de la coenzima y el cerramiento del sitio activo para producir una enzima catalíticamente eficiente (Plapp, 2010). Cabe destacar que las enzimas de la familia ADH son deshidrogenasas de cadena larga que requieren Zn como cofactor, cuya presencia es crítica para el cambio conformacional. Se ha reportado que todas las ADHs de plantas y animales caracterizadas hasta la fecha son enzimas diméricas, con dos átomos de Zn por cada subunidad unido a la proteína por grupos sulfhidrilos (Glasner, 1995). Así, la presencia de Zn le otorga una característica de metaloenzima que potencialmente podría ser hipofuncional, aunque no totalmente inhibida por una sustitución entre cationes divalentes, en este caso Zn por Pb, un metal con una alta afinidad por grupos sulfhidrilos, producto de su presencia en estos animales que han sido expuestos perinatalmente al Pb. Sin embargo, también se ha señalado que esta enzima es capaz de adaptarse a varias sustituciones sin perder su capacidad catalítica (Plapp, 2010). Por otra parte, el metabolismo de EtOH en humanos puede ser descrito aproximadamente con las constantes de velocidad estimadas de ADH y ALDH. Al respecto se ha señalado que la velocidad de eliminación de EtOH está directamente relacionada con la actividad de ADH, en tanto que el nivel estacionario de ACD (una concentración sanguínea casi constante) depende de los niveles tanto de ADH como de ALDH (Plapp y cols., 2015). Otra posibilidad de interferencia con la actividad catalítica de la enzima está relacionada con el paso limitante de su funcionalidad, que es la disponibilidad de NAD^+ ; es posible entonces que el Pb pueda interferir con la reoxidación del cofactor en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, reduciendo la eficiencia catalítica de la enzima. En apoyo a esta hipótesis, existen evidencias en diferentes modelos experimentales en las cuales se ha asociado la exposición a Pb a disfunción mitocondrial (Kumar y cols., 2015; Zhang y cols., 2015). Sin embargo, ni la posible interferencia con el sitio de unión al Zn

ni la disponibilidad del cofactor NAD⁺ han sido evaluados en este trabajo de tesis, lo que determina que estas consideraciones sean meramente especulativas y requieran de experimentos futuros para su validación.

A partir de estos resultados, la ausencia de tolerancia observada en los gusanos expuestos a Pb pertenecientes a la cepa RB2114 (figura 44) se podría explicar por la acumulación de EtOH que sería responsable de la manifestación de sus efectos sedativos. Esto implicaría un corrimiento a la izquierda de la curva bifásica de los efectos producidos por el EtOH en los gusanos expuestos a Pb. Es decir, que frente a la concentración que produce sedación en los gusanos del grupo C, es el efecto estimulante el que se observa en los expuestos a Pb. Ha sido descrito que la locomoción en *C. elegans* aumenta con la exposición a una baja concentración de EtOH (1%, es decir, aproximadamente 170 mM) pero se ralentiza frente a altas concentraciones de alcohol, resultando en incoordinación e incluso una aparente parálisis y una alimentación limitada (Wu y cols., 2019). Sin embargo, esta diferenciación en los efectos estimulantes/sedativos de EtOH se observó en nuestro estudio exclusivamente a esta concentración (200 mM), puesto que cuando se evaluaron concentraciones más bajas de EtOH (100 mM) la droga no provocó cambios en la conducta locomotora en ninguno de los grupos, posiblemente debido a que los niveles de exposición resultaron insuficientes para generar los efectos esperados. Estas diferencias tampoco se observaron a 400 mM, posiblemente debido a la manifestación de los efectos sedativos de EtOH inducidos por la exposición a dosis mayores de esta droga.

En conclusión, la exposición a Pb durante el período temprano del desarrollo indujo en *C. elegans* una disminución en la TFA, lo que puede considerarse una respuesta de menor efecto sedativo en presencia de EtOH. Este escenario podría responder a una hipofunción de la enzima ADH asociada al tratamiento con Pb como fue demostrado en el experimento con alcohol alílico. Es de destacar que es posible que dicha enzima sea la responsable de este efecto, puesto que hemos mencionado que Sterken y cols (2021) reportaron que exposiciones cortas a EtOH (menores a 2 hs) indujeron la expresión de enzimas involucradas en los procesos metabólicos de EtOH (en particular ADH). Se sugiere entonces que la mayor funcionalidad de ADH inducida por el tratamiento con EtOH a períodos cortos favorecería su metabolismo a ACD en animales C, en tanto que este efecto se vería atenuado en el grupo Pb, provocando la acumulación de EtOH el

cual, a estas bajas concentraciones, podría estar ejerciendo su efecto estimulante locomotor por liberación de DA, sugiriendo un corrimiento a la izquierda de la curva dosis/efecto. En la discusión general se profundizarán aspectos de la funcionalidad basal de este neurotransmisor en las condiciones experimentales planteadas en este trabajo de tesis y de los efectos de la exposición perinatal a Pb combinada con EtOH sobre los diferentes componentes de la sinapsis DAérgica que fueron evaluados en el capítulo 2.

Ensayo de Quimiotaxia

Introducción

C. elegans es un organismo modelo que se vale de la quimiosensación para evitar condiciones adversas, para el apareamiento, para encontrar comida y desarrollarse adecuadamente. A partir de las neuronas con cilios que presenta en su cuerpo, se expone al ambiente y detecta estos estímulos a través de un complejo y versátil sistema quimiosensorial que, si bien es muy divergente de los mamíferos, los mecanismos de regulación y comportamiento parecen estar conservados entre ellos (Bargmann, 2006).

Específicamente, *C. elegans* posee un sistema sensorial compuesto por 60 neuronas ciliadas que perciben estímulos químicos, olfativos, térmicos y mecánicos, así como también la posición relativa del cuerpo (propiocepción) (Metaxakis y cols., 2018). Muchas de las sustancias químicas que percibe pueden ser atrayentes, repelentes, o incluso atrayentes a bajas concentraciones, pero repelentes a altas concentraciones. Se ha reportado que dicho nematodo experimenta quimioatracción hacia numerosas sustancias, entre ellas benzaldehído, alcohol isoamílico, butanona, diacetil (Colbert & Bargmann, 1995), EtOH (Katner y cols., 2019), cocaína y nicotina (Engleman y cols., 2018; Sellings y cols., 2013), mientras que se es repelido por otras como nonanona (Smith y cols., 2019), 1-nonanol (Sammi y cols., 2018), quinina, soluciones de alta carga osmótica (Wang, 2019), óxido de grafeno (Xiao y cols., 2018), cobre, dodecilsulfonato de sodio (SDS) (Shao y cols., 2018), entre otros.

Históricamente, la quimiotaxis ha sido una medida utilizada para examinar el comportamiento sensorial de aproximación y evitación en los gusanos. Los fenómenos de quimiosensación conllevan un proceso de aprendizaje, los cuales interesantemente, están mediados por muchos de los circuitos presentes en organismos superiores y se encuentran muy bien descritos (revisado en Ardiel & Rankin, 2010). De hecho, muchos paradigmas de aprendizaje se basan en el emparejamiento de señales químicas con comida o inanición (Shimizu y cols., 2019). Por ejemplo, el condicionamiento de los animales con NaCl en ausencia de comida conduce a una reducción significativa de la quimiotaxis en comparación con el condicionamiento en presencia de comida (Saeki y cols., 2001; Wen y cols., 1997).

Al igual que los vertebrados, *C. elegans* ha demostrado aprendizaje no asociativo cuando genera habituación a un estímulo, ya sea a corto o largo plazo (Beck & Rankin, 1997; Ebrahimi & Rankin, 2007; Rankin y cols., 1990); o de tipo asociativo, donde forma asociaciones entre estímulos neutros y estímulos biológicamente relevantes (o apetitivos) (Law y cols., 2004). Tal es así que ha demostrado un aprendizaje condicionado por claves ambientales vinculadas a la disponibilidad de alimentos (Shimizu y cols., 2019; Wen y cols., 1997), temperatura (Mohri y cols., 2005) u oxígeno (Cheung y cols., 2005). Respecto de esto último, *C. elegans* tiene una fuerte preferencia por los niveles intermedios de oxígeno molecular, evitando tanto los niveles bajos de oxígeno (<4%) como los altos (>12%), ya que como animal aeróbico, necesita oxígeno para vivir, pero evita la hiperoxia para prevenir el daño oxidativo del ADN y otras macromoléculas (Gray y cols., 2004). La quimiotaxis hacia algunos cationes, aniones, nucleótidos cíclicos y aminoácidos fue descrita por primera vez por Ward en 1973, quien demostró que los animales pueden migrar hacia un compuesto atractivo, como el anión Cl⁻ en presencia de un alto nivel uniforme de otro compuesto atractivo, como el catión Na⁺, lo que indica que diferentes atrayentes pueden tener distintos sitios de unión (Ward, 1973).

La quimiotaxis a los odorantes volátiles está mediada por las neuronas olfativas AWA, AWB y AWC (Bargmann y cols., 1993) y la neurona polimodal ASH (Yoshida y cols., 2012). En dichas neuronas se expresan entre 500 y 1000 receptores diferentes acoplados a proteínas G (GPCR), que pueden complementarse con vías sensoriales alternativas. Después de los GPCR, hay dos sistemas de transducción de señales que destacan en la quimiosensación: uno que utiliza el guanósín monofosfato cíclico (GMPC) como segundo mensajero para abrir los canales regulados por GMPC y otro que se basa en los canales TRPV. Dichas vías sensoriales están moduladas y ajustadas, a su vez, por quinasas y fosfatasas (Bargmann, 2006).

Para algunos alcoholes, el grado de atracción o repulsión depende de características tales como su extensión. La explicación más sencilla es que en las neuronas sensoriales de *C. elegans* se encuentran dos receptores para los alcoholes, uno de los cuales reconoce los alcoholes de tamaño medio y dirige la quimiotaxis, y otro reconoce los alcoholes de cadena más larga y dirige la repulsión. Es así como Bargmann en 1993 determinó que el EtOH y el 1-propanol solo son débilmente atractivos, mientras

que el 1-butanol, el 1-pentanol y el 1-hexanol son fuertemente atractivos, pero sólo en bajas concentraciones. El 1-heptanol, el 1-octanol y el 1-nonanol no son atractivos a ninguna concentración y son repulsivos a concentraciones elevadas. Interesantemente, la repulsión observada con 1-nonanol permitió, años más tarde, elaborar un ensayo dependiente de la DA que mide el comportamiento repulsivo basado en el 1-nonanol (Bargmann y cols., 1993; Kaur y cols., 2012). Como se mencionó en capítulos anteriores, niveles de DA están relacionados con la motivación, el reconocimiento, la recompensa, la memoria, la adaptación, la regulación hormonal y el control motor en los gusanos (Felton & Johnson, 2014). Cualquier cambio en los niveles de DA alteran su comportamiento hacia los atrayentes y repelentes (Ward, 1973). En ese experimento, los gusanos con niveles normales de DA exhiben niveles óptimos de comportamiento de repulsión hacia el 1-nonanol, mientras que los gusanos con niveles disminuidos de DA exhiben un tiempo prolongado para dicha acción; por otro lado, el aumento de la DA, disminuye el tiempo de repulsión (Kaur y cols., 2012; Sammi y cols., 2018). Por lo tanto, ésta resulta una estrategia indirecta que permite inferir los niveles de DA en el gusano a partir de su capacidad para alejarse de dicha sustancia, y refleja la utilidad de la quimio atracción/repulsión como parámetro comportamental para estudiar procesos más complejos en el nematodo.

Como se mencionó previamente, la DA desempeña un papel fundamental en los procesos neurales del comportamiento relacionado con la adicción a drogas (Koob & Volkow, 2010). En *C. elegans*, se ha demostrado que la DA es importante en la plasticidad de varias conductas, incluyendo la mecanosensorial (Sanyal y cols., 2004), la plasticidad gustativa (Hukema y cols., 2008), el aprendizaje dependiente del estado (Bettinger & McIntire, 2004) y la plasticidad inducida por el EtOH (Lee y cols., 2009; Mitchell y cols., 2010).

En cuanto a las drogas de abuso, se ha demostrado que *C. elegans* desarrolla una preferencia condicionada a claves que habían sido previamente apareadas con cocaína (Musselman y cols., 2012), metanfetamina (Katner y cols., 2016; Musselman y cols., 2012) o EtOH (Bettinger & McIntire, 2004), todos procesos regulados por la señalización DAérgica (Bettinger & McIntire, 2004; Musselman y cols., 2012).

Del mismo modo, se ha reportado que *Drosophila melanogaster* muestra respuestas de preferencia condicionada a claves que habían sido previamente

emparejadas con EtOH en paradigmas de autoadministración de dicho alcohol (Kaun y cols., 2011), e incluso cangrejos de río mostraron fenómenos relacionados con la recompensa, búsqueda y abstinencia a cocaína, Anfetamina y opiáceos (Huber y cols., 2011).

La reproductibilidad de estas conductas a lo largo de la filogenética reviste suma importancia ya que los organismos inferiores en general, y *C. elegans* en particular, reflejan aspectos conservados en la neurobiología compatible con los de los vertebrados, y los convierte en un adecuado modelo para estudiar conductas asociadas a la exposición a drogas de abuso y posibles mecanismos que las medien. No obstante, no deberían ser subestimadas las limitaciones propias de estos modelos en relación a la mayor complejidad anatómica y funcional de los organismos superiores.

En cuanto a EtOH, Lee y cols crearon en *C. elegans* un ensayo de preferencia hacia esta droga y reportaron que el nematodo desarrolla atracción o preferencia como resultado de una preexposición prolongada a esa sustancia. La exposición crónica a EtOH indujo cambios adaptativos que aumentaron su preferencia por la droga y su autoexposición (Lee y cols., 2009). Estos datos indican que *C. elegans* muestra una atracción hacia el EtOH dependiente de la concentración, que resulta de una autoexposición a esta droga y en concentraciones tisulares significativas de EtOH (Alaimo y cols., 2012); más aun, su preferencia aumenta tras una exposición crónica (Katner y cols., 2019).

En investigaciones recientes también se ha reportado que incluso sin condicionamiento previo, *C. elegans* es capaz de autoexponerse a una determinada sustancia en un paradigma de quimioatracción, donde el nematodo se dirige hacia una zona en particular de la placa donde se encuentra una sustancia de abuso: cocaína, nicotina (Engleman y cols., 2018) o EtOH (Katner y cols., 2019). A su vez, esta preferencia es impedida si se realiza un tratamiento previo con naltrexona (antagonista pan-opioide) para el caso de cocaína y EtOH, o vareniclina (agonista parcial de receptores colinérgicos nicotínicos), ambos fármacos indicados para el tratamiento de adicciones en humanos, confiriéndole así la validez predictiva al modelo (Sellings y cols., 2013; Katner y cols., 2019).

En el experimento que se detalla a continuación, se siguió el protocolo descrito en Katner y cols. (2019), con ligeras modificaciones, para evaluar la respuesta de

autoexposición a EtOH. Se utilizaron nematodos de los grupos C y Pb de cepas salvajes (N2). Además, se evaluó la respuesta a SAL disuelto en diferentes vehículos (agua, EtOH al 25% v/v y EtOH al 100% v/v) en la cepa N2. Como se mencionó en capítulos previos, se ha reportado que SAL, producto de la condensación de DA y ACD, actuaría como un agonista μ -opioide. Posee un efecto reforzante positivo capaz de provocar comportamientos análogos a los generados por EtOH debido a su capacidad de liberar DA. Particularmente, en un modelo de roedores se demostraron estos efectos a través de un paradigma de preferencia asociada a un sitio (CPP) (Hipólito y cols., 2011; Matsuzawa y cols., 2000), también mediante un esquema de autoadministración, en el cual ratas se autoadministraron SAL en áreas cerebrales relacionadas con el circuito mesocorticolímbico DAérgico tales como NAc (Rodd y cols., 2003) y VTA (Rodd y cols., 2008), incluso a concentraciones de entre 1 a 2 órdenes de magnitud menores que las requeridas para la autoadministración de ACD y EtOH (Rodd y cols., 2003, 2008). Cabe destacar que hasta 2015 no se había descrito en *C. elegans* un sistema opioide, hasta que Cheong y cols reportaron la existencia de un sistema opioide endógeno en este modelo, que actúa a través de NPR-17, una proteína con secuencia similar a los receptores opioides y que regularía, entre otras acciones, la alimentación (Cheong y cols., 2015). Frente a este reporte, también resulta de utilidad evaluar si *C. elegans* es capaz de autoexponerse a SAL y si dicha respuesta se ve modificada por la exposición a Pb en estadios temprano del desarrollo.

Materiales

- Placas estériles con tapa de 6 pocillos
- Medio NGM sin NaCl ("*NaCl free*")
- Agua *miliQ*
- Etanol absoluto (Sintorgan)
- Salsolinol (Sigma-Aldrich)
- Parafilm
- Ansa de platino
- Lupa (Motic, modelo SMZ-171)
- Plancha de acetato transparente de 10 x 15 cm

Procedimiento

En este ensayo se utilizó la cepa N2 expuesta a Pb o vehículo según los protocolos descritos en secciones anteriores. Cuando los animales alcanzaron el estadio L4, se lavaron de la placa con 5 ml de agua *miliQ* y se centrifugaron a fin de obtener un pellet de gusanos. Este fue pipeteado con un tip de punta cortada a un eppendorf, donde se agregó 1 ml de agua y se centrifugó por 15 segundos. Este paso se repitió dos veces más a fin de extraer todo resto de bacteria que pudieran arrastrar de la placa de origen. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 250 μ l, y se contó bajo la lupa la cantidad de gusanos en ese pellet colocando 10 gotas de 0,5 μ l del pellet sobre porta objeto y registrando la cantidad de gusanos por gota. Finalmente se promediaron esos valores y referenciaron a la cantidad estimada de líquido presente en el eppendorf. Este dato se utilizó para calcular la cantidad de volumen a colocar en el centro de cada pocillo al momento del test.

El ensayo se desarrolló en placas de 6 pocillos que contenían medio “NaCl free”. Éste es análogo al medio NGM con la única diferencia que no se adiciona colesterol ni NaCl, con el fin de obtener un agar más límpido y transparente. Por otro lado, se preparó en plancha de acetato del tamaño de la placa, un molde en el cual se marcaron con fibra indeleble dos círculos de aproximadamente 1 cm de diámetro en extremos opuestos de la base de cada pocillo: una zona “vehículo”, donde se coloca agua, y una zona “blanco” donde se coloca EtOH o SAL, según corresponda (ver figura 52).

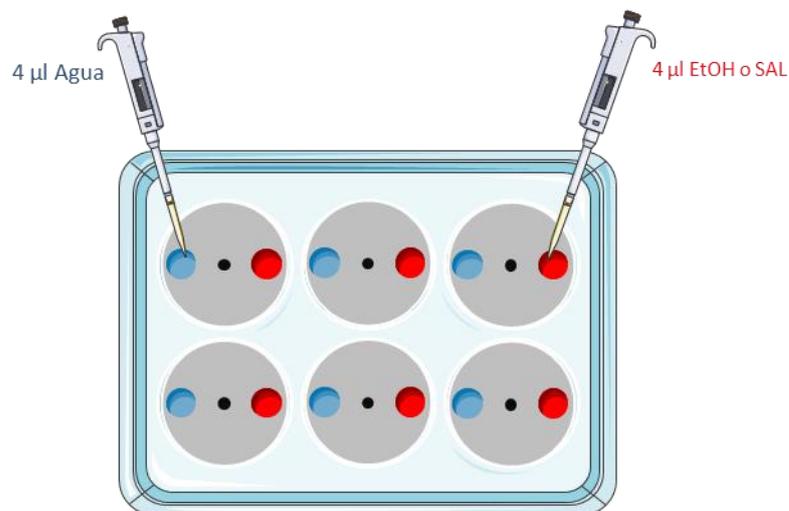


Figura 52. Representación de una placa de test de autoexposición. Los círculos azules indican la zona donde se coloca el vehículo, y los rojos, la droga. El punto negro central representa el lugar donde se colocan los nematodos. Cada pocillo equivale a una concentración diferente de la droga utilizada y colocada en la zona roja.

En el centro de cada pocillo se colocaron aproximadamente 80 a 100 gusanos y se secó el excedente de líquido con una tira de papel absorbente enrollado. Se sellaron las tapas con parafilm y al cabo de 30 minutos, se fotografió cada zona y se contó la cantidad de gusanos en cada una con el programa *Image J*. Se estableció el índice de preferencia de la siguiente manera:

$$IP = (\text{cantidad de gusanos en la zona blanco}) / (\text{gusanos en zona vehículo y blanco})$$

Análisis estadístico

Se compararon las variables grupo (C vs Pb) y concentración de droga (0 a 100% EtOH). Se realizó la prueba de Student, analizando cada concentración de EtOH por separado. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico *Statistica 10* y graficados con el programa *GraphPad Prism 8*.

Resultados

Respuesta a concentraciones crecientes de EtOH en cepas N2 (salvaje)

Se estableció como punto de partida evaluar el nivel de preferencia de gusanos salvajes expuestos a Pb y C, según el protocolo de exposición mencionado anteriormente en la sección Materiales y Métodos. Como se puede observar en la figura 53, los nematodos C mostraron un índice de preferencia similar a lo largo de todas las concentraciones de EtOH empleadas, mientras que los expuestos a Pb desarrollaron mayor preferencia hacia la zona que contenía la droga, incluso de manera estadísticamente significativa cuando se colocó EtOH al 75 % y al 100 % en dicha región (Test de Student de muestras independientes, $t = 2,88$ (75%) y $t = 2,77$ (100%), $p < 0,05$).

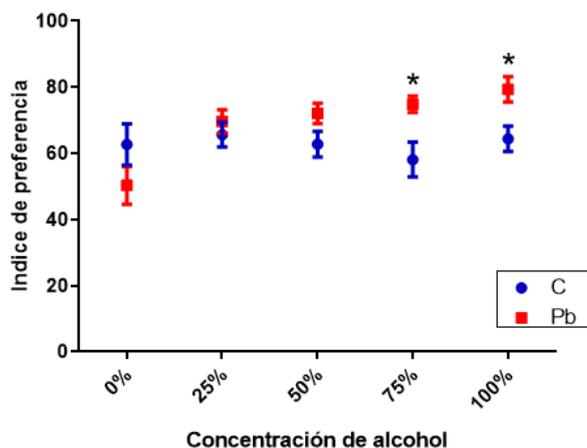


Figura 53. Respuesta de autoexposición a alcohol en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa N2. * C vs Pb, $p < 0,05$.

Ensayo de quimiotaxia en N2 frente a SAL

Como se dijo previamente, el SAL es una sustancia que actúa sobre receptores opioides de tipo μ produciendo como efecto final la liberación de DA. Este experimento se realizó colocando en la zona “blanco” concentraciones crecientes de SAL para evaluar si produce un efecto por sí solo, o un efecto aditivo o sinérgico cuando es evaluado en concomitancia con EtOH. Para ello, el agonista fue disuelto en diferentes soluciones: agua, EtOH al 25 % o EtOH al 100%. La elección de estas concentraciones (EtOH-25% y EtOH-100%) se basó en la similitud en la preferencia de los gusanos C y Pb a 25% de EtOH, pero un perfil de preferencia diferencial frente al 100% de EtOH. Como puede observarse en las figuras 54 a 56, en ningún caso el SAL generó una respuesta diferencial entre los nematodos expuestos a Pb respecto de los C, independientemente de su concentración o de la solución empleada para disolver el SAL. Sin embargo, mientras que cuando se testeó la preferencia sólo con concentraciones crecientes de EtOH (figura 53) se obtuvo una diferencia significativa entre grupos al 100% de EtOH, en este caso sólo los C mostraron un aumento en la preferencia, al punto de igualar a los gusanos expuestos a Pb (figura 56). Esto podría ser explicado como un efecto potenciador de la droga que se evidencia exclusivamente en el grupo C, mientras que en el grupo Pb podría explicarse como un posible efecto “techo”, producto de la alta preferencia por el sitio asociado a EtOH evidenciado en estos animales.

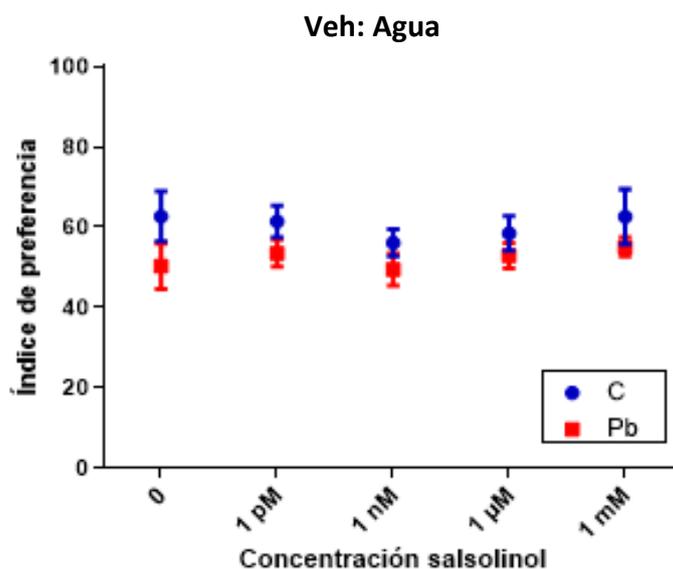


Figura 54. Respuesta de autoexposición frente a dosis crecientes de SAL disuelto en agua en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa N2.

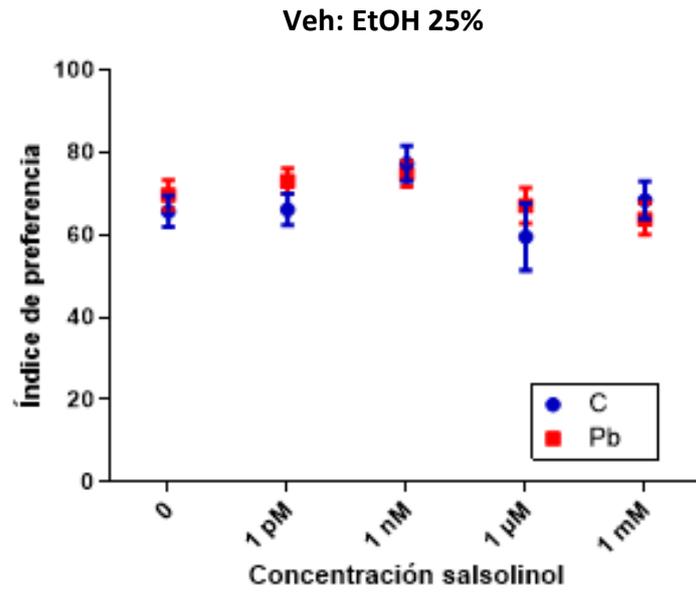


Figura 55. Respuesta de autoexposición frente a dosis crecientes de SAL disuelto en EtOH al 25% en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa N2.

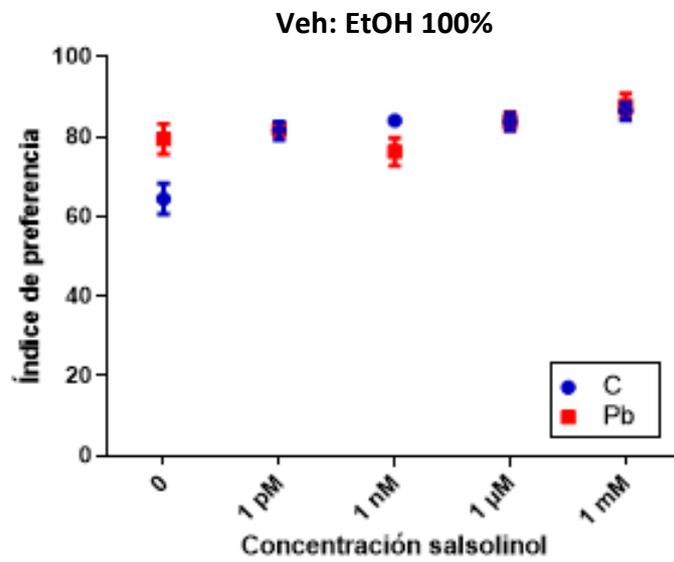


Figura 56. Respuesta de autoexposición frente a dosis crecientes de SAL disuelto en EtOH al 100% en gusanos controles y expuestos a Pb de la cepa N2.

Discusión

La adicción es un proceso muy antiguo considerado desde el punto de vista filogenético, dado que muchos mecanismos que subyacen a las conductas adictivas están presentes en los invertebrados (Engleman y cols., 2016). La perspectiva de modelar algunos estados conductuales complejos, como la "motivación" en *C. elegans*, es discutible (Mitchell y cols., 2010). Sin embargo, el desarrollo de preferencia por una señal que estaba previamente apareada con drogas sugiere que algunos aspectos conservados del comportamiento de recompensa pueden ser también evidentes en este organismo (Tzschentke, 2007). A este respecto, cada vez hay más pruebas que indican que *C. elegans* es un modelo excelente para identificar los mecanismos moleculares que median los efectos de las drogas y las posibles dianas para el desarrollo de medicamentos para diversos compuestos adictivos.

Sobre la base de estas consideraciones, un método popular para evaluar cómo los nematodos *C. elegans* responden frente a una sustancia química es el ensayo de quimiotaxis simple (Bargmann, 2006; Bargmann & Horvitz, 1991) que es considerado un tipo de paradigma de autoexposición voluntaria (Katner y cols., 2019). Al respecto, se ha reportado que *C. elegans*, al igual que otros modelos de organismos superiores, desarrolla una preferencia condicionada a claves que han sido previamente apareadas con metanfetamina o cocaína (Musselman y cols., 2012). Además, muestra preferencia por EtOH, cocaína, nicotina y se autoexpone a ellas sin condicionamiento previo (Engleman y cols., 2018; Katner y cols., 2019). Notablemente, luego de la preexposición a drogas, estos animales manifiestan sensibilización (Lee y cols., 2009) y tolerancia (Grotewiel & Bettinger, 2015), fenómenos que son característicos de la adicción en humanos (Koob & Volkow, 2010; Wise & Koob, 2014). Las similitudes en las respuestas a las drogas de abuso entre *C. elegans* y los mamíferos sugiere que estas dependerían más de las similitudes funcionales que de complejidades neuroanatómicas (Katner y cols., 2019).

Así, en relación a estas evidencias y como se detalló en la introducción de este capítulo, Lee y cols crearon un ensayo de quimiotaxia hacia EtOH y reportaron que el nematodo desarrolla atracción o preferencia como resultado de una preexposición prolongada a esta sustancia. Más aun, demostraron que dicha conducta se encuentra

regulada por DA y 5-HT, dado que cuando replicaron el ensayo con gusanos mutantes para enzimas que participan en la síntesis de esos neurotransmisores, no desarrollaron la preferencia hacia EtOH (Lee y cols., 2009). En este trabajo de tesis se decidió abordar la preferencia no condicionada al sitio de la droga. Fundamenta esta elección la hipótesis de trabajo y la intención de evaluar el efecto que podría tener un neurotóxico del desarrollo sobre la fase de iniciación de una conducta de consumo de la droga, más que el efecto de la reexposición. Por estas razones se realizó el experimento aquí descrito, ya que se ajustó mejor al modelo planteado y al paradigma de consumo voluntario de EtOH que ya hemos realizado y reportado con nuestro grupo de investigación en roedores (Mattalloni y cols., 2013, 2017; Mattalloni y cols., 2019a).

Los resultados obtenidos en este apartado demuestran que el EtOH, como sustancia reforzante positiva, fue capaz de inducir una respuesta de quimioatracción en gusanos de ambos grupos experimentales. Sin embargo, se manifestó de manera diferencial en el grupo expuesto a Pb a las dos concentraciones más altas de EtOH (75% y 100%).

Nuestros datos indican que los nematodos *C. elegans* exhiben una atracción dependiente de la concentración hacia el EtOH, lo que, según trabajos anteriores, da lugar a la autoexposición y a la elevación de las concentraciones internas de EtOH hasta niveles asociados a la motivación en humanos (Katner y cols., 2019).

Resultados similares se han obtenido en otros modelos de invertebrados, como *Drosophila melanogaster*, en los cuales vieron que estos organismos prefieren consumir alimentos que contienen EtOH en lugar de alimentos sin él, y además esta preferencia aumenta a lo largo del tiempo (Devineni y cols., 2011; Devineni & Heberlein, 2009). Aunque altas concentraciones de EtOH pueden ser tóxicas, *Drosophila* puede desarrollar tolerancia a dicha droga, de modo que mejora la recuperación después de su consumo (Berger y cols., 2004).

En cuanto a los ensayos realizados con SAL, cuando fue vehiculizado en agua, no se observó preferencia hacia la zona “blanco” con ninguno de los dos grupos, mientras que cuando fue disuelto en EtOH, ya sea 25% o 100%, se obtuvo un IP similar en ambos grupos. Dicha equiparación se produjo a expensas de un incremento en la preferencia del grupo C, no así del grupo Pb. Se puede atribuir esta respuesta al hecho de que SAL podría ejercer un efecto potenciador en el IP de los animales C pero no así en los

animales expuestos al Pb, ya que al alcanzar un 80% de preferencia hacia EtOH por sí solo, podría estar experimentando un “efecto techo”, tal como propuso en otras investigaciones (Engleman y cols., 2018; Katner y cols., 2019). Así, el aumento de la preferencia que se observa de manera gradual tanto en los C como en los Pb a medida que aumenta el porcentaje de EtOH en el medio de disolución, se podría explicar por un efecto propio del EtOH en esta cepa (test de la figura 53), más que a una acción propia del SAL.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que *C. elegans* expuestos a Pb durante el desarrollo experimentaron, en estadios larvales más avanzados, una preferencia al EtOH y que SAL no fue capaz de modificar esta respuesta. Esto guarda relación con estudios realizados en modelos de roedores, en especial los realizados por nuestro grupo de investigación, donde se observó un mayor consumo voluntario de EtOH en ratas que habían sido expuestas pre y perinatalmente a concentraciones subumbrales de Pb (Mattalloni y cols., 2013; Virgolini y cols., 2017; y revisado en Virgolini y cols., 2019), lo cual pone en evidencia la presencia de mayores respuestas motivacionales a EtOH en animales expuestos a este neurotóxico durante el desarrollo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

FINALES

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron demostrar que la exposición a concentraciones subumbrales de Pb en etapas tempranas del desarrollo en gusanos *C. elegans* provocó una leve alteración en la morfología de neuronas dopaminérgicas y puso de manifiesto un deterioro en la funcionalidad de dicho sistema, lo cual fue abordado mediante el empleo de cepas genéticamente modificadas. A su vez, pudo determinarse que los gusanos expuestos a Pb presentaron un mayor índice de preferencia hacia EtOH y una mayor tolerancia a los efectos sedativos de la droga, efecto relacionado a alteraciones en su primer paso metabólico. En conjunto, estos resultados demuestran el impacto sobre las respuestas al EtOH en la vida posterior como consecuencia de la exposición temprana a un neurotóxico del desarrollo.

Específicamente, los resultados obtenidos en el primer capítulo permitieron seleccionar la dosis a la cual la exposición perinatal a Pb no produce alteraciones morfológicas evidentes, aunque suficientes como para evidenciar alteraciones conductuales, tal como se demostró en los capítulos subsiguientes.

Al respecto, en la prueba denominada BSR, los gusanos fueron expuestos a EtOH en una placa y evaluados en un tiempo muy corto (sólo 20 segundos), 5 minutos después de su contacto inicial con el entorno, tiempo durante el cual se habituaron a las condiciones de carencia de alimento, lo cual permitió que se evidencie la motivación para conseguirlo. Es decir que esta conducta pone de manifiesto la búsqueda por parte del animal de un reforzador natural como es el alimento, imprescindible para su supervivencia. Este un comportamiento dependiente primariamente de una adecuada funcionalidad DAérgica que se vio afectado por los tóxicos bajo estudio, ambos con reconocidos efectos deletéreos sobre la sinapsis DAérgica, aunque por mecanismos diferentes pero no mutuamente excluyentes. Más aun, el análisis con las distintas cepas que presentan alteraciones en la sinapsis DAérgica, tanto a nivel pre como postsináptico, permitió concluir que el Pb en condiciones basales (cepa salvaje sin EtOH) provocó un deterioro en la funcionalidad DAérgica que se evidenció en la menor motivación para la búsqueda de alimento, lo cual no pudo ser revertido por el exceso de DA que se esperaría libere EtOH frente a su exposición. Este efecto tampoco fue observado en el grupo C, el cual sólo en condiciones de ausencia del receptor DOP-4 mostró una tendencia al mejoramiento de la conducta de BSR en presencia de EtOH, en tanto que la ausencia simultánea de los receptores DOP-1, 2 y 3 empeoró la conducta al igual que

fue observado en condiciones basales (cepa N2). Es así que la respuesta de la cepa triple mutante nula frente al EtOH podría explicarse en términos de una compensación por la falta de receptores con efectos antagónicos (excitatorios: DOP-1; inhibitorios DOP-2 y DOP-3), evidenciando un fenotipo similar a la cepa salvaje. Un resultado notable de este estudio se relaciona con la evaluación de los mutantes nulos para DOP-4, cepa en la que la ausencia de este receptor no tuvo mayor impacto en el desempeño del grupo C como sí lo hizo con los animales expuestos a Pb. Sin embargo, en los gusanos expuestos a Pb y en la mayoría de las condiciones en las cuales se presentan mutaciones en los componentes de la sinapsis DAérgica, la sola presencia de EtOH facilitó la manifestación de la conducta de BSR al promover la liberación de DA, probablemente compensando el deterioro morfológico en la sinapsis DAérgica que describimos previamente en este grupo. Nuestros resultados demuestran el rol clave del receptor postsináptico excitatorio DOP-4 en el aumento de motivación por la búsqueda del alimento en animales expuestos a Pb y en condiciones de ausencia de EtOH, lo que reflejaría la interacción de DA con este receptor para que se evidencien los efectos observados en las conductas bajo estudio.

Los dos objetivos siguientes estuvieron orientados a brindar evidencias a los componentes estimulantes (TFA) y motivacionales (quimioatracción) a EtOH que fueron valorados en la conducta de BSR, sin el posible factor de confusión de la presencia /ausencia de alimento que se sabe, es un reforzador natural.

Así, la prueba de TFA reveló que una dosis intermedia de EtOH fue capaz de poner de manifiesto la mayor actividad locomotora del grupo expuesto a Pb 10 minutos después de la exposición a esta droga, así como su mayor capacidad de recuperación del efecto sedativo de EtOH a estas dosis. En este caso, a diferencia de la prueba BSR, los animales fueron evaluados por su actividad locomotora horizontal y los tiempos de análisis fueron más extensos: 30 minutos en contraposición a los 5 minutos del ensayo de BSR. Por otra parte, los animales se evaluaron en condiciones libres de comida, lo que permitió medir selectivamente los efectos motivacionales de la droga, es decir que no fueron sometidos a un desafío de buscar alimento, observándose una mayor movilidad en presencia de EtOH y ausencia de comida. En este caso, se abordó el estudio del primer paso del metabolismo del EtOH y se determinó el rol crítico de la enzima ADH para que se manifieste una mayor tolerancia a los efectos sedativos en los animales

expuestos a Pb. Se concluyó que la actividad de esta enzima estaría disminuida como consecuencia de la exposición temprana a Pb, condicionando una acumulación de EtOH en estos animales, el cual podría facilitar la mayor respuesta locomotora observada en los gusanos salvajes debido a un corrimiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta en relación al grupo C.

Por otra parte, en el ensayo de quimioatracción se evaluó la motivación del animal a trasladarse al sitio de autoexposición al EtOH. En este caso, la presencia de una curva concentración-respuesta permitió determinar que los gusanos expuestos a Pb evidenciaron una mayor motivación que los C para trasladarse y elegir el sitio que presentaba soluciones de concentraciones máximas de la droga, lo cual demuestra que el metal no impide el movimiento de los gusanos. Es importante resaltar que, debido a los 30 minutos de espera, todos los animales tuvieron tiempo suficiente para desplazarse a un sitio vehículo o droga, independientemente de los efectos sedativos del EtOH, que se manifiestan a concentraciones mayores de la droga. En este experimento pueden descartarse efectos adversos del Pb sobre la locomoción, puesto que todos los animales tuvieron la oportunidad de elegir y el tiempo necesario para desplazarse a un sitio vehículo o droga.

Sobre la base de estos resultados y a pesar que *C. elegans* no permite modelar las complejidades de los AUDs en humanos, este nematodo ha demostrado su utilidad para reproducir aspectos importantes de la toxicidad del EtOH. En particular en este trabajo de tesis hemos demostrado en el organismo *C. elegans* los efectos adversos y a largo plazo de una exposición a dosis bajas de Pb sobre respuestas estimulantes y motivacionales a EtOH, efectos que no habían sido reportados en este modelo animal por ningún otro grupo de investigación. Además, el empleo de cepas mutantes que brindan herramientas genéticas para evidenciar comportamientos que en situaciones basales no se manifestarían, nos ha permitido aportar evidencias sobre la importancia del metabolismo de esta droga y del sistema DAérgico en estos efectos. Más aun, la alta homología genética entre especies abre la posibilidad de transferir los resultados obtenidos en este modelo a mamíferos superiores y en consecuencia al ser humano. En este sentido, hemos podido reproducir la hiperactividad y los mayores efectos motivacionales en respuesta a EtOH que describimos en ratas expuestas a Pb durante el desarrollo (Virgolini y cols., 2017). En ese caso utilizamos distintas pruebas conductuales

para evaluar el efecto de EtOH en roedores sobre: el registro de la actividad locomotora, la preferencia por EtOH en un paradigma de libre consumo y la adquisición de la conducta de autoadministración de EtOH en cajas de Skinner, lo cual implicó utilizar gran número de animales y realizar cirugías para la administración intracerebral de drogas. El uso de modelos alternativos como *C. elegans* nos permitió validar varios de nuestros resultados obtenidos previamente en roedores y avanzar, de esta manera, en la generación de conocimiento en áreas de la Neurotoxicología Experimental, respetando las normas éticas en el cuidado de usos de animales de experimentación.

Los invertebrados ofrecen muchas posibilidades para avanzar en la comprensión de los genes y los mecanismos que subyacen a los comportamientos inducidos por el alcohol, dado que se ha reportado que la droga se metaboliza sistémicamente por mecanismos similares a los de los vertebrados y que muestran signos similares de intoxicación; que las vías moleculares que median las acciones del EtOH y/o las conductas relacionadas con el AUD son similares con las de los vertebrados y que algunos parámetros de comportamientos que se utilizan como criterio para determinar AUDs en humanos (como la tolerancia, preferencia y el restablecimiento del consumo de EtOH después de períodos de abstinencia), pueden ser analizados en invertebrados. Además, las elegantes herramientas genéticas disponibles en estos modelos pueden utilizarse para diseccionar las causalidades entre los diferentes componentes de una conducta y sus contribuciones al desarrollo y mantenimiento de desórdenes del consumo de EtOH (Scholz y cols., 2013).

En este trabajo de tesis hemos reportado por primera vez la interacción entre la exposición temprana a dosis bajas de un metal con efecto neurotóxico como lo es el Pb, y su efecto a nivel del sistema DAérgico y sobre la metabolización de EtOH, lo que produciría una respuesta diferencial en dichos organismos.

Por lo arriba expuesto, esperamos que este trabajo de tesis represente un avance en el conocimiento y sienta las bases para estudios en este modelo animal sobre los mecanismos neurales de la exposición en la vida temprana a contaminantes de ubicua presencia en el ambiente, y las consecuencias que ello puede ocasionar en la respuesta a desafíos posteriores en la vida de ese individuo. Se anticipa que en el futuro *C. elegans* pueda ser usado como una plataforma de búsqueda para probar la eficacia de compuestos farmacológicos que se utilicen para el tratamiento de las conductas

asociadas a los AUDs. Del mismo modo, que su empleo como herramienta de estudio de sustancias tóxicas pueda extenderse también a otros contaminantes ambientales y aportar nuevas evidencias a sus mecanismos de acción tóxica.

TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Durante la realización de esta tesis se publicaron los siguientes trabajos científicos:

- *“Developmental lead exposure induces opposite effects on ethanol intake and locomotion in response to central vs. systemic cyanamide administration.”* Mara S. Mattalloni; Romina Deza-Ponzio; **Paula A. Albrecht**; Liliana M. Cancela; Miriam B. Virgolini, Alcohol Journal, Elsevier. (58:1-11) **2017**. FI (2016): 2,778.
- *“Modulation of Ethanol-Metabolizing Enzymes by Developmental Lead Exposure: Effects in Voluntary Ethanol Consumption”.* (Research Topic Title: Ethanol, Its Active Metabolites, and Their Mechanisms of Action: Neurophysiological and Behavioral Effects. Miriam B. Virgolini; Mara S. Mattalloni; **Paula A. Albrecht**; Romina Deza-Ponzio; Liliana M. Cancela. Frontiers Behavioral Neuroscience (11:95). **2017**. FI (2016): 3,398.
- Capítulo: *“Lead exposure and ethanol intake: oxidative stress as a converging mechanism of action”.* Libro: The Neuroscience Of Alcohol: Mechanisms And Treatment. Miriam B. Virgolini; Mara S. Mattalloni; Romina Deza-Ponzio; **Paula A. Albrecht**; Liliana M. Cancela. Editorial: Elsevier **2019** ISBN 9780128131268.
- *“Silencing brain catalase expression reduces ethanol intake in developmentally-lead-exposed rats”.* Mara S. Mattalloni; **Paula A. Albrecht**; Catalina Salinas-Luyptaertb; Romina Deza-Ponzio; María E. Quintanilla; Mario Herrera-Marschitzb; Liliana M. Cancela; Mario Rivera-Meza; Miriam B. Virgolini. Neurotoxicology, Elsevier (70:180-186) **2019**. FI (2017): 3,076.
- *“Brain ethanol-metabolizing enzymes are differentially expressed in lead-exposed animals after voluntary ethanol consumption: Pharmacological approaches”.* Mara S. Mattalloni; Romina Deza-Ponzio; **Paula A. Albrecht**; Lucía E. Fernandez-Hubeid; Liliana M. Cancela; Miriam B. Virgolini. NeuroToxicology (75:174-185) **2019**.FI (2014): 3.379.

- *“Learning Experiences Comprising Central Ethanol Exposure In Rat Neonates: Impact Upon Respiratory Plasticity And The Activity Of The Brain Catalase System”.*

Verónica Trujillo; Ana F. Macchione; **Paula A. Albrecht**; Miriam B. Virgolini; Juan C. Molina. Alcohol Journal, Elsevier. (88:11-27) **2020**. FI (2019): 2,500.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhack, M. (2016). Dopaminergic neurons modulate locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/056192>
- Acquas, E., Scheggi, S., & Peana, A. T. (2019). Neurobiological aspects of ethanol-derived salsolinol. In *Neuroscience of Alcohol: Mechanisms and Treatment*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813125-1.00024-6>
- Adam, S. A. (2009). The nuclear transport machinery in *Caenorhabditis elegans*: A central role in morphogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(5), 576–581.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.03.013>
- Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention of the Centers for Disease Control and Prevention. (2012). *Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention*. 1–65.
- Ahamed, M., & Siddiqui, M. K. J. (2007). Environmental lead toxicity and nutritional factors. *Clinical Nutrition*, 26(4), 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.03.010>
- Akinyemi, A. J., Miah, M. R., Ijomone, O. M., Tsatsakis, A., Soares, F. A. A., Tinkov, A. A., Skalny, A. V., Venkataramani, V., & Aschner, M. (2019). Lead (Pb) exposure induces dopaminergic neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*: Involvement of the dopamine transporter. *Toxicology Reports*, 6(July), 833–840. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.001>
- Al-Jawadi, A. A., Al-Mola, Z. W., & Al-Jomard, R. A. (2009). Determinants of maternal and umbilical blood lead levels: A cross-sectional study, Mosul, Iraq. *BMC Research Notes*, 2, 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-47>
- Alaimo, J. T., Davis, S. J., Song, S. S., Burnette, C. R., Grotewiel, M., Shelton, K. L., Pierce-Shimomura, J. T., Davies, A. G., & Bettinger, J. C. (2012). Ethanol Metabolism and Osmolarity Modify Behavioral Responses to Ethanol in *C. elegans*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(11), 1840–1850. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01799.x>
- Albert, P. S., & Riddle, D. L. (1988). Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Developmental Biology*, 126(2), 270–293. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90138-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90138-8)
- Allen, A. T., Maher, K. N., Wani, K. A., Betts, K. E., & Chase, D. L. (2011). Coexpressed D1- and D2-like dopamine receptors antagonistically modulate acetylcholine release in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 188(3), 579–590. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128512>
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009). WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction. *WormAtlas*.
<https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>
- Anbalagan, C., Lafayette, I., Antoniou-Kourounioti, M., Gutierrez, C., Martin, J. R., Chowdhuri, D. K., & De Pomerai, D. I. (2013). Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis*

- elegans to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. *Ecotoxicology*, 22(1), 72–85. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1004-2>
- Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.003>
- Anderson, G. L., Boyd, W. A., & Williams, P. L. (2001). Assessment of Sublethal Endpoints for Toxicity Testing With the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4), 833. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<0833:AOSEFT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<0833:AOSEFT>2.0.CO;2)
- Anderson, G. L., Cole, R. D., & Williams, P. L. (2004). Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1235–1240. <https://doi.org/10.1897/03-264>
- Anderson, J. L., Albergotti, L., Ellebracht, B., Huey, R. B., & Phillips, P. C. (2011). Does thermoregulatory behavior maximize reproductive fitness of natural isolates of *Caenorhabditis elegans*? *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-157>
- Antoshechkin, I., & Sternberg, P. W. (2007). The versatile worm: Genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nature Reviews Genetics*, 8(7), 518–532. <https://doi.org/10.1038/nrg2105>
- Aprison, E. Z., & Ruvinsky, I. (2014). Balanced trade-offs between alternative strategies shape the response of *C. elegans* reproduction to chronic heat stress. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105513>
- Aragon, C. M. G., Rogan, F., & Amit, Z. (1992). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. *Biochemical Pharmacology*, 44(1), 93–98. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90042-H](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90042-H)
- Ardiel, E. L., Giles, A. C., Yu, A. J., Lindsay, T. H., Lockery, S. R., & Rankin, C. H. (2016). Dopamine receptor DOP-4 modulates habituation to repetitive photoactivation of a *C. elegans* polymodal nociceptor. *Learning and Memory*, 23(10), 495–503. <https://doi.org/10.1101/lm.041830.116>
- Ardiel, E. L., & Rankin, C. H. (2010). An elegant mind: Learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 17(4), 191–201. <https://doi.org/10.1101/lm.960510>
- Baranowska-Bosiacka, I., Falkowska, A., Gutowska, I., Gąssowska, M., Kolasa-Wołoskiuk, A., Tarnowski, M., Chibowska, K., Goschorska, M., Lubkowska, A., & Chlubek, D. (2017). Glycogen metabolism in brain and neurons – astrocytes metabolic cooperation can be altered by pre- and neonatal lead (Pb) exposure. *Toxicology*, 390, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.007>
- Baranowska-Bosiacka, I., Listos, J., Gutowska, I., Machoy-Mokrzyńska, A., Kolasa-Wołoskiuk, A., Tarnowski, M., Puchałowicz, K., Prokopowicz, A., Talarek, S., Listos, P., Wasik, A., & Chlubek, D. (2016). Effects

- of perinatal exposure to lead (Pb) on purine receptor expression in the brain and gliosis in rats tolerant to morphine analgesia. *Toxicology*, 339, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.10.003>
- Bargmann, C. I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>
- Bargmann, C. I., Hartweg, E., & Horvitz, H. R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell*, 74(3), 515–527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H)
- Bargmann, C. I., & Horvitz, H. R. (1991). Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 251(4998), 1243–1246. <https://doi.org/10.1126/science.2006412>
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beck, C. D. O., & Rankin, C. H. (1997). Long-term habituation is produced by distributed training at long ISIs and not by massed training or short ISIs in *Caenorhabditis elegans*. *Animal Learning & Behavior*, 25(4), 446–457. <https://doi.org/10.3758/BF03209851>
- Bellinger, D. C., Malin, A., & Wright, R. O. (2018). The Neurodevelopmental Toxicity of Lead: History, Epidemiology, and Public Health Implications. In *Advances in Neurotoxicology* (1st ed., Vol. 2, pp. 1–26). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2018.03.009>
- Ben Hamida, S., Boulos, L.-J., McNicholas, M., Charbogne, P., & Kieffer, B. L. (2017). Mu opioid receptors in GABAergic neurons of the forebrain promote alcohol reward and drinking. *Addiction Biology*, 24(1), 28–39. <https://doi.org/10.1111/adb.12576>
- Benedetto, A., Au, C., Avila, D. S., Milatovic, D., & Aschner, M. (2010). Extracellular Dopamine Potentiates Mn-Induced Oxidative Stress, Lifespan Reduction, and Dopaminergic Neurodegeneration in a BLI-3–Dependent Manner in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 6(8), e1001084. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001084>
- Benoit-Marand, M., Jaber, M., & Gonon, F. (2000). Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: Functional consequences. *European Journal of Neuroscience*, 12(8), 2985–2992. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00155.x>
- Berger, K. H., Heberlein, U., & Moore, M. S. (2004). Rapid and chronic: Two distinct forms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28(10), 1469–1480. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000141817.15993.98>
- Berríos-Cárcamo, P., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., Vasiliou, V., Zapata-Torres, G., & Rivera-Meza, M. (2017). Racemic Salsolinol and its Enantiomers Act as Agonists of the μ -Opioid Receptor by Activating the Gi Protein-Adenylate Cyclase Pathway. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00253>

- Berríos-Cárcamo, P., Rivera-Meza, M., Herrera-Marschitz, M., & Zapata-Torres, G. (2019). Molecular modeling of salsolinol, a full Gi protein agonist of the μ -opioid receptor, within the receptor binding site. *Chemical Biology and Drug Design*, *94*(2), 1467–1477. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13523>
- Bettinger, J. C., & McIntire, S. L. (2004). State-dependency in *C. elegans*. *Genes, Brain and Behavior*, *3*(5), 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00080.x>
- Bettinger, J. C., & Davies, A. G. (2014). The role of the BK channel in ethanol response behaviors: Evidence from model organism and human studies. *Frontiers in Physiology*, *5* AUG(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00346>
- Bettinger, J. C., Leung, K., Bolling, M. H., Goldsmith, A. D., & Davies, A. G. (2012). Lipid environment modulates the development of acute tolerance to ethanol in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, *7*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035192>
- Bose-O'Reilly, S., Yabe, J., Makumba, J., Schutzmeier, P., Ericson, B., & Caravanos, J. (2018). Lead intoxicated children in Kabwe, Zambia. *Environmental Research*, *165*(September 2017), 420–424. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.024>
- Boyd, W. A., Cole, R. D., Anderson, G. L., & Williams, P. L. (2003). The effects of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, *22*(12), 3049–3055. <https://doi.org/10.1897/02-565>
- Bradner, J. M., Kalia, V., Lau, F. K., Sharma, M., Bucher, M. L., Johnson, M., Chen, M., Walker, D. I., Jones, D. P., & Miller, G. W. (2021). Genetic or Toxicant-Induced Disruption of Vesicular Monoamine Storage and Global Metabolic Profiling in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences*, *180*(2), 313–324. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab011>
- Braun, J. M., Kahn, R. S., Froehlich, T., Auinger, P., & Lanphear, B. P. (2006). Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environmental Health Perspectives*, *114*(12), 1904–1909. <https://doi.org/10.1289/ehp.9478>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 77, 71–94. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300625>
- Brenner, S. (2002). NOBEL LECTURE: Nature's Gift to Science. *Bioscience Reports*, *23*(5–6), 225–237. <https://doi.org/10.1023/B:BIRE.0000019186.48208.f3>
- Bressler, J. P., Belloni-Olivi, L., Forman, S., & Goldstein, G. W. (1996). Distinct mechanisms of neurotransmitter release from PC 12 cells exposed to lead. *Journal of Neuroscience Research*, *46*(6), 678–685. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19961215\)46:6<678::AID-JNR5>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19961215)46:6<678::AID-JNR5>3.0.CO;2-C)
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *287*(4 56-4).

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>

- Burkey, R. T., Nation, J. R., & Bratton, G. R. (1994). Chronic lead exposure attenuates ethanol-induced hypoalgesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47(2), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90004-3)
- Caito, S., & Aschner, M. (2017). Developmental Neurotoxicity of Lead. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 131, pp. 3–12). https://doi.org/10.1007/978-3-319-60189-2_1
- Calhoun, A. J., Tong, A., Pokala, N., Fitzpatrick, J. A. J., Sharpee, T. O., & Chalasani, S. H. (2015). Neural mechanisms for evaluating environmental variability in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 86(2), 428–441. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.026>
- Camarini, R., Laura, M., Pires, N., & Calil, H. M. (2000). Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. *Int J Neuropsychopharmacol*, 3(4), 303–309. <https://doi.org/10.1017/S14611457000211X>
- Canfield, R. L., Gendle, M. H., & Cory-Slechta, D. A. (2004). Impaired Neuropsychological Functioning in Lead-Exposed Children. *Developmental Neuropsychology*, 26(1), 513–540. <https://doi.org/10.1207/s15326942dn2601>
- Carvalho, A. F., Heilig, M., Perez, A., Probst, C., & Rehm, J. (2019). Alcohol use disorders. *The Lancet*, 394(10200), 781–792. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31775-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31775-1)
- Casey, W., Jacobs, A., Maull, E., Matheson, J., Clarke, C., & Lowit, A. (2015). A new path forward: The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program’s Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 170–173.
- Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1975). *The Dauer larva, a Post-Embryonic Nematode Developmental elegans Variant of the Caenorhabditis*. 342, 326–342.
- Cavallaro, A., Lavanco, G., Giammanco, M., & Cannizzaro, E. (2018). Acetaldehyde and salsolinol in ethanol’s two-step mechanism of action: An overview. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale*, 90(2), 109–115. <https://doi.org/10.4081/jbr.2017.6751>
- Cecil, K. M., Brubaker, C. J., Adler, C. M., Dietrich, K. N., Altaye, M., Egelhoff, J. C., Wessel, S., Elangovan, I., Hornung, R., Jarvis, K., & Lanphear, B. P. (2008). Decreased brain volume in adults with childhood lead exposure. *PLoS Medicine*, 5(5), 0741–0749. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050112>
- Cecil, K. M., Dietrich, K. N., Altaye, M., Egelhoff, J. C., Lindquist, D. M., Brubaker, C. J., & Lanphear, B. P. (2011). Proton magnetic resonance spectroscopy in adults with childhood lead exposure.

- Environmental Health Perspectives*, 119(3), 403–408. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002176>
- Cermak, N., Yu, S. K., Clark, R., Huang, Y. C., & Flavell, S. W. (2020). Whole-organism behavioral profiling reveals a role for dopamine in state-dependent motor program coupling in *C. elegans*. *BioRxiv*, 1–34. <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.011015>
- Chakraborty, S., Chen, P., Bornhorst, J., Schwerdtle, T., Schumacher, F., Kleuser, B., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2015). Loss of pdr-1/parkin influences Mn homeostasis through altered ferroportin expression in *C. elegans*. *Metallomics*, 7(5), 847–856. <https://doi.org/10.1039/c5mt00052a>
- Chalfie, M. (2009). GFP: Lighting up life. *Nobel Lectures: Chemistry: 2006 - 2010*, 106(25), 124–143. https://doi.org/10.1142/9789814635660_0003
- Chase, D. (2007). Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *WormBook*, 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.132.1>
- Chase, D., Pepper, J., & Koelle, M. (2004). Mechanism of extrasynaptic dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/nn1316>
- Chatterjee, I., Ibanez-Ventoso, C., Vijay, P., Singaravelu, G., Baldi, C., Bair, J., Ng, S., Smolyanskaya, A., Driscoll, M., & Singson, A. (2013). Dramatic fertility decline in aging *C. elegans* males is associated with mating execution deficits rather than diminished sperm quality. *Experimental Gerontology*, 48(11), 1156–1166. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.014>
- Chen, P., Martinez-Finley, E. J., Bornhorst, J., Chakraborty, S., & Aschner, M. (2013). Metal-induced neurodegeneration in *C. elegans*. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00018>
- Cheong, M. C., Artyukhin, A. B., You, Y. J., & Avery, L. (2015). An opioid-like system regulating feeding behavior in *C. Elegans*. *ELife*, 2015(4), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.06683.001>
- Cheung, B. H. H., Cohen, M., Rogers, C., Albayram, O., & De Bono, M. (2005). Experience-dependent modulation of *C. elegans* behavior by ambient oxygen. *Current Biology*, 15(10), 905–917. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.017>
- Colbert, H. A., & Bargmann, C. I. (1995). Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron*, 14(4), 803–812. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90224-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90224-4)
- Cole, R. D., Anderson, G. L., & Williams, P. L. (2004). The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194(3), 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.09.013>
- Consortium The *C. elegans* Sequencing. (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*, 282(5396), 2012–2018.

- Cookman, G. R., King, W., & Regan, C. M. (1987). Chronic Low-Level Lead Exposure Impairs Embryonic to Adult Conversion of the Neural Cell Adhesion Molecule. *Journal of Neurochemistry*, 49(2), 399–403. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb02879.x>
- Correa, M., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2000). Lead Acetate Potentiates Brain Catalase Activity and Enhances Ethanol-Induced Locomotion in Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(1), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00204-5)
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. G. (1999). Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: The role of brain catalase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(5), 799–805. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04186.x>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Cory-Slechta, D. A. (1995). Relationships Between Lead-Induced Learning Impairments and Changes in Dopaminergic, Cholinergic, and Glutamatergic Neurotransmitter System Functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35(1), 391–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.002135>
- Cory-Slechta, D. A., Virgolini, M. B., Thiruchelvam, M., Weston, D. D., & Bauter, M. R. (2004). Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 112(6), 717–730. <https://doi.org/10.1289/ehp.6481>
- Cory-Slechta, D. A., & Widzowski, D. V. (1991). Low level lead exposure increases sensitivity to the stimulus properties of dopamine D1 and D2 agonists. *Brain Research*, 553(1), 65–74. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90231-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90231-J)
- Curtis D. Klaassen. (2008). *CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY THE BASIC SCIENCE OF POISONS* (Curtis D. Klaassen (Ed.); 7th ed.). McGraw-Hill. <https://doi.org/10.1036/0071470514>
- David, H. E., Dawe, A. S., de Pomerai, D. I., Jones, D., Candido, E. P. M., & Daniells, C. (2003). CONSTRUCTION AND EVALUATION OF A TRANSGENIC hsp16-GFP-lacZ CAENORHABDITIS ELEGANS STRAIN FOR ENVIRONMENTAL MONITORING. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1), 111. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2003\)022<0111:caeoat>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2003)022<0111:caeoat>2.0.co;2)
- Davies, A. G., Blackwell, G. G., Raabe, R. C., & Bettinger, J. C. (2015). An Assay for Measuring the Effects of Ethanol on the Locomotion Speed of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Visualized Experiments*, 15(98), 477–491. <https://doi.org/10.3791/52681>
- Davies, A. G., & McIntire, S. L. (2004). Using *C. elegans* to screen for targets of ethanol and behavior-altering drugs. *Biological Procedures Online*, 6(1), 113–119. <https://doi.org/10.1251/bpo79>

- Davies, A. G., Pierce-Shimomura, J. T., Kim, H., VanHoven, M. K., Thiele, T. R., Bonci, A., Bargmann, C. I., & McIntire, S. L. (2003). A Central Role of the BK Potassium Channel in Behavioral Responses to Ethanol in *C. elegans*. *Cell*, *115*(6), 655–666. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00979-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00979-6)
- Davis, J. M. (1990). Risk assessment of the developmental neurotoxicity of lead. *Neurotoxicology*, *11*(2), 285–291. <http://europepmc.org/abstract/MED/2234545>
- Davis, J. R., Li, Y., & Rankin, C. H. (2008). Effects of developmental exposure to ethanol on *Caenorhabditis elegans*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *32*(5), 853–867. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00639.x>
- Deehan, G., Hauser, S. R., Wilden, J., Truitt, W., & Rodd, Z. (2013). Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(August), 104. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00104>
- Deitrich, R. A. (2004). Acetaldehyde: Déjà vu du jour. *Journal of Studies on Alcohol*, *65*(5), 557–572. <https://doi.org/10.15288/jsa.2004.65.557>
- Deuri, R., Kuma Jena, A., Sharma, P., Sharma, S., & Prakash Singh, S. (2018). *Caenorhabditis elegans* as a biological model. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *7*(5), 2097–2101.
- Devineni, A. V., & Heberlein, U. (2009). Preferential Ethanol Consumption in *Drosophila* Models Features of Addiction. *Current Biology*, *19*(24), 2126–2132. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.070>
- Devineni, A. V., McClure, K., Guarnieri, D., Corl, A., Wolf, F., Eddison, M., & Heberlein, U. (2011). The genetic relationships between ethanol preference, acute ethanol sensitivity, and ethanol tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Fly*, *5*(3), 191–199. <https://doi.org/10.4161/fly.5.3.16987>
- Devoto, P., Flore, G., Ibba, A., Fratta, W., & Pani, L. (2001). Lead intoxication during intrauterine life and lactation but not during adulthood reduces nucleus accumbens dopamine release as studied by brain microdialysis. *Toxicology Letters*, *121*(3), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00336-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00336-8)
- Dhawan, R., Dusenbery, D. B., & Williams, P. L. (1999). Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, *58*(7), 451–462. <https://doi.org/10.1080/009841099157179>
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. (2013). American Psychiatric Association.
- Dietrich, K. N., Douglas, R. M., Succop, P. A., Berger, O. G., & Bornschein, R. L. (2001). Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicology and Teratology*, *23*(6), 511–518. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(01\)00184-2](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(01)00184-2)
- Dignam, T., Kaufmann, R. B., LeSturgeon, L., & Brown, M. J. (2019). Control of Lead Sources in the United

- States, 1970-2017. *Journal of Public Health Management and Practice*, 25, S13–S22.
<https://doi.org/10.1097/PHH.0000000000000889>
- Disalvo, L., Aab, C., Pereyras, S., Pattín, J., Apezteguía, M., Iannicelli, J. C., Girardelli, A., & Varea, A. (2009). Plumbemia en Niños de la Ciudad de La Plata, Argentina y su Relación con la Deficiencia de Hierro y los Factores de Exposición al Plomo. *Revista Chilena de Pediatría*, 82(1), 63–64.
<https://doi.org/10.4067/S0370-41062011000100009>
- Douaihy, A., & Glance, J. (2013). Neurobiology of Substance Use Disorders. In *Substance Use Disorders* (pp. 17–26). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780199898169.003.0002>
- Du, M., & Wang, D. (2009). The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(3), 314–320.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.11.011>
- Duerr, J. S., Frisby, D. L., Gaskin, J., Duke, A., Asermely, K., Huddleston, D., Eiden, L. E., & Rand, J. B. (1999). The cat-1 gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a vesicular monoamine transporter required for specific monoamine-dependent behaviors. *Journal of Neuroscience*, 19(1), 72–84.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-01-00072.1999>
- Dues, D. J., Schaar, C. E., Johnson, B. K., Bowman, M. J., Winn, M. E., Senchuk, M. M., & Van Raamsdonk, J. M. (2017). Uncoupling of oxidative stress resistance and lifespan in long-lived *isp-1* mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 108(April), 362–373.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.004>
- Ebrahimi, C. M., & Rankin, C. H. (2007). Early patterned stimulation leads to changes in adult behavior and gene expression in *C. elegans*. *Genes, Brain and Behavior*, 6(6), 517–528.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00278.x>
- Engleman, E. A., Katner, S. N., & Neal-Beliveau, B. S. (2016). *Caenorhabditis elegans* as a Model to Study the Molecular and Genetic Mechanisms of Drug Addiction. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.10.019>
- Engleman, E. A., Steagall, K. B., Bredhold, K. E., Breach, M., Kline, H. L., Bell, R. L., Katner, S. N., & Neal-Beliveau, B. S. (2018). *Caenorhabditis elegans* show preference for stimulants and potential as a model organism for medications screening. *Frontiers in Physiology*, 9(AUG).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01200>
- Enrico, P., Sirca, D., Mereu, M., & Peana, A. (2009). Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. *Drug and Alcohol ...*, 100(3), 265–271.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2008.10.010>
- Fang-Yen, C., Alkema, M. J., & Samuel, A. D. T. (2015). Illuminating neural circuits and behaviour in *Caenorhabditis elegans* with optogenetics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B:*

- Biological Sciences*, 370(1677). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0212>
- Félix, M. A., & Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22), R965–R969. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>
- Felton, C. M., & Johnson, C. M. (2014). Dopamine signaling in *C. elegans* is mediated in part by HLH-17-dependent regulation of extracellular dopamine levels. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(6), 1081–1089. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010819>
- Fire, A. Z. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(37), 6966–6984. <https://doi.org/10.1002/anie.200701979>
- Flora, S., Gautam, P., & Kushwaha, P. (2012). Lead and ethanol co-exposure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats. *Alcohol and Alcoholism*, 47(2), 92–101. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agr152>
- Flora, S., Kumar, D., Sachan, S. R. S., & Gupta, S. Das. (1991). Combined exposure to lead and ethanol on tissue concentration of essential metals and some biochemical indices in rat. *Biological Trace Element Research*, 28(2), 157–164. <https://doi.org/10.1007/BF02863081>
- Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., & Diana, M. (2004). *Acetaldehyde Increases Dopaminergic Neuronal Activity in the VTA*. 530–536. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300326>
- Formisano, R., Mersha, M. D., Caplan, J., Singh, A., Rankin, C. H., Tavernarakis, N., & Dhillon, H. S. (2020). Synaptic vesicle fusion is modulated through feedback inhibition by dopamine auto-receptors. *Synapse*, 74(1), 6–11. <https://doi.org/10.1002/syn.22131>
- Fortune, T., & Lurie, D. I. (2009). Chronic low-level lead exposure affects the monoaminergic system in the mouse superior olivary complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 542–558. <https://doi.org/10.1002/cne.21978>
- Frézal, L., & Félix, M.-A. (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *ELife*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>
- Froehlich, T. E., Lanphear, B. P., Auinger, P., Hornung, R., Epstein, J. N., Braun, J., & Kahn, R. S. (2009). Association of tobacco and lead exposures with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 124(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0738>
- Gainutdinov, M. K., Timoshenko, A. K., Zakharov, S. V, Gainutdinov, T. M., & Kalinnikova, T. B. (2009). Acetaldehyde modulates ethanol action in the nervous system of *C. elegans*. *The Return of The Worm Breeder's Gazette*.
- Galter, D., Carmine, A., Buervenich, S., Duester, G., & Olson, L. (2003). Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *European Journal of Biochemistry*, 270(6), 1316–1326. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03502.x>

- Gass, J. T., & Olive, M. F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical Pharmacology*, 75(1), 218–265. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.039>
- Giles, A. C., & Rankin, C. H. (2009). Behavioral and genetic characterization of habituation using *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.08.004>
- Gjorgjieva, J., Biron, D., & Haspel, G. (2014). Neurobiology of *Caenorhabditis elegans* locomotion: Where do we stand? *BioScience*, 64(6), 476–486. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu058>
- Goldstein, D. B. (1986). Effect of alcohol on cellular membranes. *Annals of Emergency Medicine*, 15(9), 1013–1018. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(86\)80120-2](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(86)80120-2)
- Goldstein, G. W. (1993). Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology*, 14(2–3), 97–101. <http://europepmc.org/abstract/MED/8247416>
- Goyer, R. A. (1996). Results of Lead Research: Prenatal Exposure and Neurological Consequences. *Environmental Health Perspectives*, 104, 1050–1054.
- Gray, J. M., Karow, D. S., Lu, H., Chang, A. J., Chang, J. S., Ellis, R. E., Marietta, M. A., & Bargmann, C. I. (2004). Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature*, 430(6997), 317–322. <https://doi.org/10.1038/nature02714>
- Grönqvist, H., Nilsson, J. P., & Robling, P.-O. (2017). *Early Lead Exposure and Outcomes in Adulthood*. www.ifau.se
- Grotewiel, M., & Bettinger, J. C. (2015). *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* as Discovery Platforms for Genes Involved in Human Alcohol Use Disorder. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(8), 1292–1311. <https://doi.org/10.1111/acer.12785>
- Gulson, B. L., Mizon, K. J., Korsch, M. J., Palmer, J. M., & Donnelly, J. B. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation—a summary of long-term research. *Science of The Total Environment*, 303(1–2), 79–104. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00355-8)
- Guo, Y., Yang, Y., & Wang, D. (2009). Induction of reproductive deficits in nematode *Caenorhabditis elegans* exposed to metals at different developmental stages. *Reproductive Toxicology*, 28(1), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.03.007>
- Haider, S., Saleem, S., Tabassum, S., Khaliq, S., Shamim, S., Batool, Z., Parveen, T., Inam, Q. U. A., & Haleem, D. J. (2013). Alteration in plasma corticosterone levels following long term oral administration of lead produces depression like symptoms in rats. *Metabolic Brain Disease*, 28(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9374-y>
- Hald, J., & Jacobsen, E. (1948). A drug sensitising the organism to ethyl alcohol. *The Lancet*, 252(6539), 1001–1004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(48\)91514-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(48)91514-1)

- Hall, F. S., Sora, I., & Uhl, G. R. (2001). Ethanol consumption and reward are decreased in μ -opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology Volume*, *154*, 43–49. <https://doi.org/10.1007/s002130000622>
- Hanna-Attisha, M., LaChance, J., Sadler, R. C., & Champney Schnepf, A. (2016). Elevated Blood Lead Levels in Children Associated With the Flint Drinking Water Crisis: A Spatial Analysis of Risk and Public Health Response. *American Journal of Public Health*, *106*(2), 283–290. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.303003>
- Hansen, C., Buteler, R., Procopovich, E., Pagan, G., Díaz, B., Gait, N., Medicina, M., Mezzano, M., Britos, S., & Fulginiti, S. (1999). Blood lead levels in children of Cordoba City. *Medicina*, *59*(2), 167–170. <http://europepmc.org/abstract/MED/10413895>
- He, L., Poblenz, A. T., Medrano, C. J., & Fox, D. A. (2000). Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(16), 12175–12184. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.12175>
- Heilig, M., & Egli, M. (2006). Pharmacological treatment of alcohol dependence: Target symptoms and target mechanisms. *Pharmacology and Therapeutics*, *111*(3), 855–876. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.02.001>
- Heilig, M., Goldman, D., Berrettini, W., & O'Brien, C. P. (2011). Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(11), 670–684. <https://doi.org/10.1038/nrn3110>
- Helmcke, K. J., Avila, D. S., & Aschner, M. (2010). Utility of *Caenorhabditis elegans* in high throughput neurotoxicological research. *Neurotoxicology and Teratology*, *32*(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.11.005>
- Helmcke, K. J., Syversen, T., Miller, D. M., & Aschner, M. (2009). Characterization of the effects of methylmercury on *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *240*(2), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.013>
- Hendler, R. A., Ramchandani, V. A., Gilman, J., & Hommer, D. W. (2013). Stimulant and Sedative Effects of Alcohol. In *Curr Topics Behav Neurosci* (Vol. 13, pp. 489–509). https://doi.org/10.1007/7854_2011_135
- Hernberg, S. (2000). Lead poisoning in a historical perspective. *American Journal of Industrial Medicine*, *38*(3), 244–254. [https://doi.org/10.1002/1097-0274\(200009\)38:3<244::AID-AJIM3>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0274(200009)38:3<244::AID-AJIM3>3.0.CO;2-F)
- Hershko, C., Abrahamov, A., Moreb, J., Hersh, M., Shiffman, R., Shahin, A., Richter, E. D., Konijn, A. M., Weissenberg, E., Graver, F., Avni, A., Shahin, S., Eisenberg, A., & Yaffe, Y. (1984). Lead Poisoning in a West Bank Arab Village. *Archives of Internal Medicine*, *144*(10), 1969–1973. <https://doi.org/10.1001/archinte.1984.04400010077015>

- Hill, R. C., Egidio de Carvalho, C., Salogiannis, J., Schlager, B., Pilgrim, D., & Haag, E. S. (2006). Genetic Flexibility in the Convergent Evolution of Hermaphroditism in *Caenorhabditis* Nematodes. *Developmental Cell*, *10*(4), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.002>
- Hillbom, M. (1999). Oxidants antioxidants alcohol and stroke. *Frontiers in Bioscience*, *4*(5), A481. <https://doi.org/10.2741/A481>
- Hills, T., Brockie, P. J., & Maricq, A. V. (2004). Dopamine and Glutamate Control Area-Restricted Search Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, *24*(5), 1217–1225. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1569-03.2004>
- Hipólito, L., Martí-Prats, L., Sánchez-Catalán, M. J., Polache, A., & Granero, L. (2011). Induction of conditioned place preference and dopamine release by salsolinol in posterior VTA of rats: Involvement of μ -opioid receptors. *Neurochemistry International*, *59*(5), 559–562. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.04.014>
- Hipólito, L., Sánchez-Catalán, M. J., Granero, L., & Polache, A. (2009). Local salsolinol modulates dopamine extracellular levels from rat nucleus accumbens: Shell/core differences. *Neurochemistry International*, *55*(4), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.014>
- Hipólito, L., Sánchez-Catalán, M. J., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. (2010). Locomotor stimulant effects of acute and repeated intrategmental injections of salsolinol in rats: Role of μ -opioid receptors. *Psychopharmacology*, *209*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1751-9>
- Hosono, R., Mitsui, Y., Sato, Y., Aizawa, S., & Miwa, J. (1982). Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*. Effects of Sex, Sterilization, and Temperature. *Experimental Gerontology*, *17*(2), 163–172. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(82\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(82)90052-3)
- Huber, R., Panksepp, J. B., Nathaniel, T., Alcaro, A., & Panksepp, J. (2011). Drug-sensitive reward in crayfish: An invertebrate model system for the study of SEEKING, reward, addiction, and withdrawal. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(9), 1847–1853. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2010.12.008>
- Hukema, R. K., Rademakers, S., & Jansen, G. (2008). Gustatory plasticity in *C. elegans* involves integration of negative cues and NaCl taste mediated by serotonin, dopamine, and glutamate. *Learning & Memory*, *15*(11), 829–836. <https://doi.org/10.1101/LM.994408>
- Hunt, P. R. (2016). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, *37*(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>
- Hunt, P. R., Olejnik, N., Bailey, K. D., Vaught, C. A., & Sprando, R. L. (2018). *C. elegans* Development and Activity Test detects mammalian developmental neurotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, *121*(June), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.061>

- Jamal, M., Ameno, K., Uekita, I., Kumihashi, M., Wang, W., & Ijiri, I. (2007). Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats. *NeuroToxicology*, 28(6), 1245–1248. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.05.002>
- Janin, Y., Couinaud, C., Stone, A., & Wise, L. (1985). The “lead-induced colic” syndrome in lead intoxication. *Surgery Annual*, 17, 287–307. <http://europepmc.org/abstract/MED/3156432>
- Jayanthi, L. D., Apparsundaram, S., Malone, M. D., Ward, E., Miller, D. M., Eppler, M., & Blakely, R. D. (1998). The *Caenorhabditis elegans* Gene T23G5.5 Encodes an Antidepressant- and Cocaine-Sensitive Dopamine Transporter. *Molecular Pharmacology*, 54(4), 601–609. <https://molpharm.aspetjournals.org/content/54/4/601.short>
- Jones, D. C., & Miller, G. W. (2008). The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochemical Pharmacology*, 76(5), 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.010>
- Jones, R. L., Homa, D. M., Meyer, P. A., Brody, D. J., Caldwell, K. L., Pirkle, J. L., & Brown, M. J. (2009). Trends in blood lead levels and blood lead testing among US children aged 1 to 5 years, 1988–2004. *Pediatrics*, 123(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3608>
- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(5), 387–399. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kalinnikova, T. B., Timoshenko, A. K., Kolsanova, R. R., Zakharov, S. V., Gainutdinov, T. M., & Shaguidullin, R. (2012). Acetaldehyde action on the organism of free living soil nematodes *Caenorhabditis elegans* N2- and IPE1-lines. *“Toksikologicheskii Vestnik” (Toxicological Review)*, 4, 45–48.
- Kang, L., Gao, J., Schafer, W. R., Xie, Z., & Xu, X. Z. S. (2010). *C. elegans* TRP Family Protein TRP-4 Is a Pore-Forming Subunit of a Native Mechanotransduction Channel. *Neuron*, 67(3), 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.032>
- Karahanian, E., Rivera-Meza, M., Tampier, L., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2015). Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addiction Biology*, 20(2), 336–344. <https://doi.org/10.1111/adb.12130>
- Katner, S. N., Bredhold, K. E., Steagall, K. B., Bell, R. L., Neal-Beliveau, B. S., Cheong, M. C., & Engleman, E. A. (2019). *Caenorhabditis elegans* as a model system to identify therapeutics for alcohol use disorders. *Behavioural Brain Research*, 365(January), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.015>
- Katner, S. N., Neal-Beliveau, B. S., & Engleman, E. A. (2016). Embryonic Methamphetamine Exposure Inhibits Methamphetamine Cue Conditioning and Reduces Dopamine Concentrations in Adult N2 *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Neuroscience*, 38(2), 139–149.

<https://doi.org/10.1159/000445761>

- Kaun, K. R., Azanchi, R., Maung, Z., Hirsh, J., & Heberlein, U. (2011). A *Drosophila* model for alcohol reward. *Nature Neuroscience* 2011 14:5, 14(5), 612–619. <https://doi.org/10.1038/nn.2805>
- Kaur, S., Raj Sammi, S., Jadiya, P., & Nazir, A. (2012). RNAi of cat-2, a Putative Tyrosine Hydroxylase, Increases Alpha Synuclein Aggregation and Associated Effects in Transgenic *C. elegans*. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 11(4), 387–394. <https://doi.org/10.2174/187152712800792811>
- Ke, T., Santamaria, A., Rocha, J. B. T., Tinkov, A., Bornhorst, J., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2020b). Cephalic Neuronal Vesicle Formation is Developmentally Dependent and Modified by Methylmercury and sti-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Neurochemical Research*, 45(12), 2939–2948. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03142-8>
- Khanh, N. (2018). A Systematic Review *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*) -A Host Model Organism to Study Drug-Induced Responses to the Effects of Stimulant and Depressant Drugs. *Journal of Biomedical Research & Studies*, 1(1), 1–24.
- Kindt, K. S., Quast, K. B., Giles, A. C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C. H. H., & Schafer, W. R. (2007). Dopamine Mediates Context-Dependent Modulation of Sensory Plasticity in *C. elegans*. *Neuron*, 55(4), 662–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.023>
- Kolovou, G. D., Salpea, K. D., Anagnostopoulou, K. K., & Mikhailidis, D. P. (2006). Alcohol Use, Vascular Disease, and Lipid-Lowering Drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1), 1–7. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.102269>
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the Brain Antireward System. *Annual Review of Psychology*, 59(1), 29–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093548>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Krum, B. N., Martins, A. C., Queirós, L., Ferrer, B., Milne, G. L., Soares, F. A. A., Fachinnetto, R., & Aschner, M. (2020). Haloperidol Interactions with the dop-3 Receptor in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Neurobiology*, 58(1), 304–316. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02124-9>
- Kumar, S., Jain, S., Aggarwal, C. S., & Ahuja, G. K. (1987). Encephalopathy due to inorganic lead exposure in an adult. *Japanese Journal of Medicine*, 26(2), 253–254. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine1962.26.253>
- Kumar, V., Tripathi, V. K., Jahan, S., Agrawal, M., Pandey, A., Khanna, V. K., & Pant, A. B. (2015). Lead

- Intoxication Synergies of the Ethanol-Induced Toxic Responses in Neuronal Cells—PC12. *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1504–1520. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8928-x>
- Kumarasingha, R., Palombo, E. A., Bhave, M., Yeo, T. C., Lim, D. S. L., Tu, C. L., Shaw, J. M., & Boag, P. R. (2014). Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening tools. *International Journal for Parasitology*, 44(5), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.008>
- Kwon, J. Y., Hong, M., Choi, M. S., Kang, S., Duke, K., Kim, S., Lee, S., & Lee, J. (2004). Ethanol-response genes and their regulation analyzed by a microarray and comparative genomic approach in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, 83(4), 600–614. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.10.008>
- Lamadrid-Figueroa, H., Téllez-Rojo, M. M., Hernández-Avila, M., Trejo-Valdivia, B., Solano-González, M., Mercado-García, A., Smith, D., Hu, H., & Wright, R. O. (2007). Association between the plasma/whole blood lead ratio and history of spontaneous abortion: a nested cross-sectional study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-7-22>
- Lanphear, B. P., Hornung, R., Khoury, J., Yolton, K., Baghurst, P., Bellinger, D. C., Canfield, R. L., Dietrich, K. N., Bornschein, R., Greene, T., Rothenberg, S. J., Needleman, H. L., Schnaas, L., Wasserman, G., Graziano, J., & Roberts, R. (2005). Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 894–899. <https://doi.org/10.1289/ehp.7688>
- Law, E., Nuttley, W., Biology, D. van der K.-C., & 2004, U. (2004). Contextual taste cues modulate olfactory learning in *C. elegans* by an occasion-setting mechanism. *Elsevier*.
- LeBlanc, A. E., Kalant, H., & Gibbins, R. J. (1975). Acute tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacologia*, 41(1), 43–46. <https://doi.org/10.1007/BF00421304>
- Lee, J., Jee, C., & McIntire, S. L. (2009). Ethanol preference in *C. elegans*. *Genes, Brain and Behavior*, 8(6), 578–585. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00513.x>
- Leung, C. K., Deonaraine, A., Strange, K., & Choe, K. P. (2011). High-throughput screening and biosensing with fluorescent *C. elegans* strains. *Journal of Visualized Experiments*, 51, 1–5. <https://doi.org/10.3791/2745>
- Leung, M., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1), 5–28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121>
- Li, C., Malone, K. E., Porter, P. L., Weiss, N. S., Tang, M. T. C., & Daling, J. R. (2003). The Relationship between Alcohol Use and Risk of Breast Cancer by Histology and Hormone Receptor Status among Women 65–79 Years of Age. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 12(10), 1061–1066.

- Li, D., Zhao, H., & Gelernter, J. (2012). Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504Lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians. *Human Genetics*, *131*(5), 725–737. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1116-4>
- Li, H., Borinskaya, S., Yoshimura, K., Kal'ina, N., Marusin, A., Stepanov, V. A., Qin, Z., Khaliq, S., Lee, M. Y., Yang, Y., Mohyuddin, A., Gurwitz, D., Mehdi, S. Q., Rogaev, E., Jin, L., Yankovsky, N. K., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (2009). Refined geographic distribution of the oriental ALDH2* 504Lys (nee 487Lys) variant. *Annals of Human Genetics*, *73*(3), 335–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00517.x>
- Li, W., Feng, Z., Sternberg, P. W., & Xu, X. Z. S. (2006). A C. elegans stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue. *Nature*, *440*(7084), 684–687. <https://doi.org/10.1038/nature04538>
- Li, W. H., Shi, Y. C., Tseng, I. L., & Liao, V. H. C. (2013). Protective Efficacy of Selenite against Lead-Induced Neurotoxicity in Caenorhabditis elegans. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062387>
- Lieber, C. S. (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, *34*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.008>
- Lin, C. H., Sa, S., Chand, J., & Rankin, C. H. (2013). Dynamic and Persistent Effects of Ethanol Exposure on Development: An In Vivo Analysis During and After Embryonic Ethanol Exposure in Caenorhabditis elegans. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *37*(SUPPL.1), 190–198. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01856.x>
- Lindgren, N., Usiello, A., Goiny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E., & Fisone, G. (2003). Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 4305–4309. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730708100>
- Listos, J., Baranowska-Bosiacka, I., Talarek, S., Listos, P., Orzelska, J., Fidecka, S., Gutowska, I., Kolasa, A., Rybicka, M., & Chlubek, D. (2013). The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology*, *310*, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.007>
- MacNeil, L. T., & Walhout, A. J. (2013). Food, pathogen, signal. *Worm*, *2*(4), e26454. <https://doi.org/10.4161/worm.26454>
- Magzamen, S., Amato, M. S., Imm, P., Havlena, J. A., Coons, M. J., Anderson, H. A., Kanarek, M. S., & Moore, C. F. (2015). Quantile regression in environmental health: Early life lead exposure and end-of-grade exams. *Environmental Research*, *137*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.004>

- Mahaffey, K. R. (1990). Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention. *Environmental Health Perspectives*, 89, 75–78. <https://doi.org/10.1289/ehp.908975>
- Major RH. (1931). Ann Med Hist. In *Ann Med Hist* (Vol. 3, pp. 218–227).
- Martínez, S., Simonella, L., Hansen, C., Rivolta, S., Cancela, L., & Virgolini, M. (2013). Blood lead levels and enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Córdoba, Argentina, after the ban of leaded gasoline. *Human & Experimental Toxicology*, 32(5), 449–463. <https://doi.org/10.1177/0960327112454893>
- Martins, E., Varea, A., Apezteguía, M., González, H. F., Girardelli, A., Caro, L. S., Lobisuto, M., Delgado, G., & Disalvo, L. (2014). Prenatal lead exposure and relationship with maternal exposure determinants in a public maternity hospital of La Plata, Argentina. *Science of The Total Environment*, 473–474, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.128>
- Martins, E., Varea, A., & Hernández, K. (2016). Blood lead levels in children aged between 1 and 6 years old in La Plata, Argentina. Identification of risk factors for lead exposure. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 114(6), 543–548. <https://doi.org/10.5546/aap.2016.eng.543>
- Mason, L. H., Harp, J. P., & Han, D. Y. (2014). Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/840547>
- Matsuba, C., Ostrow, D. G., Salomon, M. P., Tolani, A., & Baer, C. F. (2013). Temperature, stress and spontaneous mutation in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. *Biology Letters*, 9(1). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0334>
- Matsuzawa, S., Suzuki, T., & Misawa, M. (2000). Involvement of mu-Opioid Receptor in the Salsolinol-Associated Place Preference in Rats Exposed to Conditioned Fear Stress. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(3), 366–372. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb04624.x>
- Mattalloni, M. S., Albrecht, P. A., Salinas-Luypaert, C., Deza-Ponzio, R., Quintanilla, M. E., Herrera-Marschitz, M., Cancela, L. M., Rivera-Meza, M., & Virgolini, M. B. (2019a). Silencing brain catalase expression reduces ethanol intake in developmentally-lead-exposed rats. *NeuroToxicology*, 70(August 2018), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.10.010>
- Mattalloni, M. S., De Giovanni, L. N., Molina, J. C., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2013). Participation of catalase in voluntary ethanol consumption in perinatally low-level lead-exposed rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(10), 1632–1642. <https://doi.org/10.1111/acer.12150>
- Mattalloni, M. S., Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2017). Developmental lead exposure induces opposite effects on ethanol intake and locomotion in response to central vs. systemic cyanamide administration. *Alcohol*, 58, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.11.002>

- Mattalloni, M. S., Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., Fernandez-Hubeid, L. E., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2019b). Brain ethanol-metabolizing enzymes are differentially expressed in lead-exposed animals after voluntary ethanol consumption: Pharmacological approaches. *NeuroToxicology*, 75(September), 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.09.011>
- Mattalloni, M. S., Deza-Ponzio, R., De Giovanni, L., & Virgolini, M. B. (2014). ¿Algo de plomo es demasiado plomo para los organismos en desarrollo? *Bitacora Digit. UNC*, 2, 1–14.
- Maulik, M., Mitra, S., Bult-Ito, A., Taylor, B. E., & Vayndorf, E. M. (2017). Behavioral phenotyping and pathological indicators of Parkinson's disease in *C. elegans* models. *Frontiers in Genetics*, 8(JUN), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00077>
- Maupas, E. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes. *Arch Zool Exp*, 8, 463–624.
- McDonald, P. W., Hardie, S. L., Jessen, T. N., Carvelli, L., Matthies, D. S., & Blakely, R. D. (2007). Vigorous motor activity in *Caenorhabditis elegans* requires efficient clearance of dopamine mediated by synaptic localization of the dopamine transporter DAT-1. *Journal of Neuroscience*, 27(51), 14216–14227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2992-07.2007>
- McDonald, P. W., Jessen, T., Field, J. R., & Blakely, R. D. (2006). Dopamine signaling architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6), 593–618. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9003-6>
- McIntire, S. . (2010). Ethanol. *WormBook*, 1–6. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.40.1>
- McVey, K. A., Snapp, I. B., Johnson, M. B., Negga, R., Pressley, A. S., & Fitsanakis, V. A. (2016). Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicology and Teratology*, 55, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.002>
- Melchior, C., Collins, M. A., & Cohen, G. (1982). The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals. *Critical Reviews in Toxicology*, 9(4), 313–356. <https://doi.org/10.3109/10408448209037496>
- Melentijevic, I., Toth, M. L., Arnold, M. L., Guasp, R. J., Harinath, G., Nguyen, K. C., Taub, D., Parker, J. A., Neri, C., Gabel, C. V., Hall, D. H., & Driscoll, M. (2017). *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature*, 542(7641), 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature21362>
- Melis, M., Carboni, E., Caboni, P., & Acquas, E. (2015). Key role of salsolinol in ethanol actions on dopamine neuronal activity of the posterior ventral tegmental area. *Addiction Biology*, 20(1), 182–193. <https://doi.org/10.1111/adb.12097>
- Menzel, R., Swain, S. C., Hoess, S., Claus, E., Menzel, S., Steinberg, C. E. W., Reifferscheid, G., & Stürzenbaum, S. R. (2009). Gene expression profiling to characterize sediment toxicity - A pilot study

- using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *BMC Genomics*, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-160>
- Metaxakis, A., Petratos, D., & Tavernarakis, N. (2018). Multimodal sensory processing in *Caenorhabditis elegans*. *Open Biology*, *8*(6). <https://doi.org/10.1098/rsob.180049>
- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela, C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A., & Harrison, N. L. (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABAA and glycine receptors. *Nature*, *389*(6649), 385–389. <https://doi.org/10.1038/38738>
- Miller, D. K., Nation, J. R., Jost, T. E., Schell, J. B., & Bratton, G. R. (2000). Differential effects of adult and perinatal lead exposure on morphine-induced locomotor activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *67*(2), 281–290. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00362-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00362-2)
- Misra, U. K., Bradford, B. U., Handier, J. A., & Thurman, R. G. (1992). Chronic Ethanol Treatment Induces H₂O₂ Production Selectively in Pericentral Regions of the Liver Lobule. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *16*(5), 839–842. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01878.x>
- Mitchell, P. H., Bull, K., Glautier, S., Hopper, N. a, Holden-Dye, L., & O'Connor, V. (2007). The concentration-dependent effects of ethanol on *Caenorhabditis elegans* behaviour. *The Pharmacogenomics Journal*, *7*(6), 411–417. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500440>
- Mitchell, P., Mould, R., Dillon, J., Glautier, S., Andrianakis, I., James, C., Pugh, A., Holden-Dye, L., & O'Connor, V. (2010). A Differential Role for Neuropeptides in Acute and Chronic Adaptive Responses to Alcohol: Behavioural and Genetic Analysis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, *5*(5), e10422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010422>
- Mitra, P., Sharma, S., Purohit, P., & Sharma, P. (2017). Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *54*(7–8), 506–528. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1408562>
- Moghaddam, B., & Bolinao, M. L. (1994). Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, *178*(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90299-2)
- Mohri, A., Kodama, E., Kimura, K. D., Koike, M., Mizuno, T., & Mori, I. (2005). Genetic Control of Temperature Preference in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *169*(3), 1437–1450. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036111>
- Monnet-Tschudi, F., Zurich, M.-G., Boschat, C., Corbaz, A., & Honegger, P. (2006). Involvement of Environmental Mercury and Lead in the Etiology of Neurodegenerative Diseases. *Reviews on Environmental Health*, *21*(2), 105–117. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.2.105>

- Monteiro, L., Brinke, M., dos Santos, G., Traunspurger, W., & Moens, T. (2014). Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. *European Journal of Soil Biology*, *62*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.02.005>
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Vallés, S., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (1995). Ethanol Increases Cytochrome P4502E1 and Induces Oxidative Stress in Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *65*(6), 2561–2570. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65062561.x>
- Montoliu, Carmina, Vallés, S., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (1994). Ethanol-Induced Oxygen Radical Formation and Lipid Peroxidation in Rat Brain: Effect of Chronic Alcohol Consumption. *Journal of Neurochemistry*, *63*(5), 1855–1862. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051855.x>
- Morán-Martínez, J., Carranza-Rosales, P., Morales-Vallarta, M., A Heredia-Rojas, J., Bassol-Mayagoitia, S., Denys Betancourt-Martínez, N., & M Cerda-Flores, R. (2013). Chronic environmental exposure to lead affects semen quality in a Mexican men population. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *11*(4), 267–274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639755>
- Morgan, P. G., & Sedensky, M. M. (1995). Mutations Affecting Sensitivity to Ethanol in the Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *19*(6), 1423–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1995.tb01002.x>
- Możdżeń, E., Kajta, M., Wąsik, A., Lenda, T., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2015). Salsolinol, an Endogenous Compound Triggers a Two-Phase Opposing Action in the Central Nervous System. *Neurotoxicity Research*, *27*(3), 300–313. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9511-y>
- Muntner, P., He, J., Vupputuri, S., Coresh, J., & Batuman, V. (2003). Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: Results from NHANES III. *Kidney International*, *63*(3), 1044–1050. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00812.x>
- Murakami, H., Bessinger, K., Hellmann, J., & Murakami, S. (2008). Manipulation of serotonin signal suppresses early phase of behavioral aging in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Aging*, *29*(7), 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.01.013>
- Musselman, H. N., Neal-Beliveau, B., Nass, R., & Engleman, E. A. (2012). Chemosensory cue conditioning with stimulants in a *Caenorhabditis elegans* animal model of addiction. *Behavioral Neuroscience*, *126*(3), 445–456. <https://doi.org/10.1037/a0028303>
- Musshoff, F., Schmidt, P., Dettmeyer, R., Priemer, F., Jachau, K., & Madea, B. (2000). Determination of dopamine and dopamine-derived (R)-/(S)-salsolinol and norsalsolinol in various human brain areas using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Science International*, *113*(1–3), 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00225-5)
- Mutwakil, M. H. A. Z., Reader, J. P., Holdich, D. M., Smithurst, P. R., Candido, E. P. M., Jones, D., Stringham, E. G., & De Pomerai, D. I. (1997). Use of stress-inducible transgenic nematodes as biomarkers of

- heavy metal pollution in water samples from an English river system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(2), 146–153. <https://doi.org/10.1007/s002449900167>
- Naoi, M. (2004). Dopamine-Derived Salsolinol Derivatives as Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitors: Occurrence, Metabolism and Function in Human Brains. *NeuroToxicology*, 25(1–2), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00099-8)
- Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M., & Blakely, R. D. (2002). Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3264–3269. <https://doi.org/10.1073/pnas.042497999>
- Nation, J. R., Baker, D. M., Taylor, B., & Clark, D. E. (1986). Dietary lead increases ethanol consumption in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 100(4), 525–530. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.100.4.525>
- Nation, J. R., Cardon, A. L., Heard, H. M., Valles, R., & Bratton, G. R. (2003). Perinatal lead exposure and relapse to drug-seeking behavior in the rat: A cocaine reinstatement study. *Psychopharmacology*, 168(1–2), 236–243. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1405-2>
- Nation, J. R., Dugger, L. M., Dwyer, K. K., Bratton, G. R., & Grover, C. A. (1991). The effects of dietary lead on ethanol-reinforced responding. *Alcohol and Alcoholism*, 26(4), 473–480. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045141>
- Nation, J. R., Smith, K. R., & Bratton, G. R. (2004). Early developmental lead exposure increases sensitivity to cocaine in a self-administration paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.10.009>
- Needleman, H. L., McFarland, C., Ness, R. B., Fienberg, S. E., & Tobin, M. J. (2002). Bone lead levels in adjudicated delinquents: A case control study. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(6), 711–717. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(02\)00269-6](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(02)00269-6)
- Negga, R., Stuart, J. A., Machen, M. L., Salva, J., Lizek, A. J., Richardson, S. J., Osborne, A. S., Mirallas, O., McVey, K. A., & Fitsanakis, V. A. (2012). Exposure to glyphosate-and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of c-aminobutyric acid and dopamine neurons in *caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicity Research*, 21(3), 281–290. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9274-7>
- Niccols, A. (2007). Fetal alcohol syndrome and the developing socio-emotional brain. *Brain and Cognition*, 65(1), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.02.009>
- Nicholas, W. L., Dougherty, E. C., & Hansen, E. L. (1959). Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 77, 218–236.
- Nigg, J. T., Nikolas, M., Mark Knottnerus, G., Cavanagh, K., & Friderici, K. (2010). Confirmation and

- extension of association of blood lead with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD symptom domains at population-typical exposure levels. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 51(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2009.02135.x>
- Nigon, V. (1949). Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nematodes libres. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 11(1–132).
- Nordmann, R., Ribière, C., & Rouach, H. (1992). Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(3), 219–240. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90030-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90030-K)
- NourEddine, D., Miloud, S., & Abdelkader, A. (2005). Effect of lead exposure on dopaminergic transmission in the rat brain. *Toxicology*, 207(3), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.10.016>
- Nutt, D., King, L. A., Saulsbury, W., & Blakemore, C. (2007). Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *The Lancet*, 369(9566), 1047–1053. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60464-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60464-4)
- Pandey, P., & Harbinder, S. (2012). The *Caenorhabditis elegans* D2-like dopamine receptor DOP-2 physically interacts with GPA-14, a Gαsubunit. *Journal of Molecular Signaling*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-7-3>
- Pandey, P., Singh, A., Kaur, H., Ghosh-Roy, A., & Babu, K. (2021). Increased dopaminergic neurotransmission results in ethanol dependent sedative behaviors in *Caenorhabditis elegans*. In *PLoS Genetics* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009346>
- Pang, S., & Curran, S. P. (2014). Adaptive Capacity to Bacterial Diet Modulates Aging in *C. elegans*. *Cell Metabolism*, 19(2), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.005>
- Pastor, R., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. . (2005). and delta-opioid receptors on the locomotor-stimulating actions of ethanol. *Drug and Alcohol Dependence*, 78, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.11.007>
- Patananan, A. N., Budenholzer, L. M., Eskin, A., Torres, E. R., & Clarke, S. G. (2015). Ethanol-induced differential gene expression and acetyl-CoA metabolism in a longevity model of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 61(2), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.11.010>
- Patrick, L. (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*.
- Peana, A. T., & Acquas, E. (2013). Behavioral and biochemical evidence of the role of acetaldehyde in the motivational effects of ethanol. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(July), 86. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00086>

- Peana, A. T., Sánchez-Catalán, M. J., Hipólito, L., Rosas, M., Porru, S., Bennardini, F., Romualdi, P., Caputi, F. F., Candeletti, S., Polache, A., Granero, L., & Acquas, E. (2017). Mystic Acetaldehyde: The Never-Ending Story on Alcoholism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00081>
- Peng, G. S., & Yin, S. J. (2009). Effect of the allelic variants of aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 and alcohol dehydrogenase ADH1B*2 on blood acetaldehyde concentrations. *Human Genomics*, *3*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-2-121>
- Peredney, C. L., & Williams, P. L. (2000). Utility of *Caenorhabditis elegans* for assessing heavy metal contamination in artificial soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *39*(1), 113–118. <https://doi.org/10.1007/s002440010086>
- Peres, T. V., Horning, K. J., Bornhorst, J., Schwerdtle, T., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2019). Small Molecule Modifiers of In Vitro Manganese Transport Alter Toxicity In Vivo. *Biological Trace Element Research*, *188*(1), 127–134. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1531-7>
- Perkins, L. A., Hedgecock, E. M., Thomson, J. N., & Culotti, J. G. (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, *117*(2), 456–487. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90314-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90314-3)
- Petrella, L. N. (2014). Natural Variants of *C. elegans* Demonstrate Defects in Both Sperm Function and Oogenesis at Elevated Temperatures. *PLoS ONE*, *9*(11), e112377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112377>
- Piepponen, T. P., Kiiänmaa, K., & Ahtee, L. (2002). Effects of ethanol on the accumbal output of dopamine, GABA and glutamate in alcohol-tolerant and alcohol-nontolerant rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *74*(1), 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00937-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00937-1)
- Pierce-Shimomura, J. T., Morse, T. M., & Lockery, S. R. (1999). The Fundamental Role of Pirouettes in *Caenorhabditis elegans* Chemotaxis. *The Journal of Neuroscience*, *19*(21), 9557–9569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09557.1999>
- Pietrzykowski, A. Z., & Treistman, S. N. (2008). The molecular basis of tolerance. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, *31*(4), 298–309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584007>
- Plapp, B. V. (2010). Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *493*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.001>
- Plapp, Bryce V., Leidal, Kevin G., Murch, Bruce P., Green, David W. (2015). Contribution of liver alcohol dehydrogenase to metabolism of alcohols in rats. *Chemico-Biological Interactions*, *234*, 85–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.040>

- Pohorecky, L. A. A. (1977). Biphasic action of ethanol. *Biobehavioral Reviews*, 1(4), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0147-7552\(77\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0147-7552(77)90025-0)
- Pokora, M. J., Richfield, E. K., & Cory-Slechta, D. A. (2002). Preferential Vulnerability of Nucleus Accumbens Dopamine Binding Sites to Low-Level Lead Exposure: Time Course of Effects and Interactions with Chronic Dopamine Agonist Treatments. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1540–1550. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67041540.x>
- Polak, N., Read, D. S., Jurkschat, K., Matzke, M., Kelly, F. J., Spurgeon, D. J., & Stürzenbaum, S. R. (2014). Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 160(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.12.001>
- Pounds, J. G., Long, G. J., & Rosen, J. F. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental Health Perspectives*, 91, 17–32. <https://doi.org/10.1289/ehp.919117>
- Quertemont, E., & Didone, V. (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Research and Health*, 29(4), 258–265.
- Quertemont, E., Grant, K. A., Correa, M., Arizzi, M. N., Salamone, J. D., Tambour, S., Aragon, C. M. G., McBride, W. J., Rodd, Z. A., Goldstein, A., Zaffaroni, A., Li, T. K., Pisano, M., & Diana, M. (2005). The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(2), 221–234. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000156185.39073.D2>
- Quintanilla, M. E., Rivera-Meza, M., Berríos-Cárcamo, P., Cassels, B. K., Herrera-Marschitz, M., & Israel, Y. (2016). (R)-Salsolinol, a product of ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake. *Addiction Biology*, 21(6), 1063–1071. <https://doi.org/10.1111/adb.12268>
- Raabe, R. C., Mathies, L. D., Davies, A. G., & Bettinger, J. C. (2014). The Omega-3 Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid Is Required for Normal Alcohol Response Behaviors in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 9(8), e105999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105999>
- Ramchandani, V. A., Bosron, W. F., & Li, T. K. (2001). Research advances in ethanol metabolism. *Pathologie Biologie*, 49(9), 676–682. [https://doi.org/10.1016/S0369-8114\(01\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S0369-8114(01)00232-2)
- Rand, J., & Nonet, M. (1997). Synaptic transmission. *C. Elegans II*, 22.
- Rand, J.B, Duerr, J. ., & Frisby, D. . (2000). Neurogenetics of vesicular transporters in *C. elegans*. *The FASEB Journal*, 14, 2414–2422.
- Rand, James B., & Johnson, C. D. (1995). Chapter 8 Genetic Pharmacology: Interactions between Drugs and Gene Products in *Caenorhabditis elegans*. *Methods in Cell Biology*, 48(C), 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61388-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61388-6)

- Rankin, Catharine H., & Broster, B. S. (1992). Factors Affecting Habituation and Recovery From Habituation in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behavioral Neuroscience*, *106*(2), 239–249. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.239>
- Rankin, Catherine H., Beck, C. D. O., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: A new model system for the study of learning and memory. *Behavioural Brain Research*, *37*(1), 89–92. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90074-O](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90074-O)
- Raskin, N. H. (1975). Alcoholism or Acetaldehydism? *The New England Journal of Medicine*, *292*, 422–423. <https://doi.org/10.1056/NEJM197502202920811>
- Reinke, S. N., Hu, X., Sykes, B. D., & Lemire, B. D. (2010). *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size. *Molecular Genetics and Metabolism*, *100*(3), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.03.013>
- Riddle DL, Blumenthal T, M. B. (1997). *C.elegans II* (Cold Sprin).
- Rios, M., Habecker, B., Sasaoka, T., Eisenhofer, G., Tian, H., Landis, S., Chikaraishi, D., & Roffler-Tarlov, S. (1999). Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience*, *19*(9), 3519–3526. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03519.1999>
- Rocha, A., Valles, R., Cardon, A. L., Bratton, G. R., & Nation, J. R. (2005). Enhanced acquisition of cocaine self-administration in rats developmentally exposed to lead. *Neuropsychopharmacology*, *30*(11), 2058–2064. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300729>
- Rocha, A., Valles, R., Hart, N., Bratton, G. R., & Nation, J. R. (2008). Developmental lead exposure attenuates methamphetamine dose-effect self-administration performance and progressive ratio responding in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *89*(4), 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.02.004>
- Rodd-henricks, Z. A., Melendez, R. I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W. J., & Li, T. (2002). *The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats*. *72*, 55–64.
- Rodd, Z. A., Bell, R. L., Zhang, Y., Goldstein, A., Zaffaroni, A., McBride, W. J., & Li, T. K. (2003). Salsolinol produces reinforcing effects in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring (P) rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *27*(3), 440–449. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000056612.89957.B4>
- Rodd, Z. A., Oster, S. M., Ding, Z.-M., Toalston, J. E., Deehan, G., Bell, R. L., Li, T.-K., & McBride, W. J. (2008). The Reinforcing Properties of Salsolinol in the Ventral Tegmental Area: Evidence for Regional Heterogeneity and the Involvement of Serotonin and Dopamine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *32*(2), 230–239. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00572.x>

- Rodríguez-Ramos, Á., Gámez-del-Estal, M. M., Porta-de-la-Riva, M., Cerón, J., & Ruiz-Rubio, M. (2017). Impaired Dopamine-Dependent Locomotory Behavior of *C. elegans* Neuroligin Mutants Depends on the Catechol-O-Methyltransferase COMT-4. *Behavior Genetics*, 47(6), 596–608. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9868-9>
- Roh, J. Y., Lee, J., & Choi, J. (2006). Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed nematode *Caenorhabditis elegans*: A potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(11), 2946–2956. <https://doi.org/10.1897/05-676R.1>
- Roh, J. Y., Park, Y. J., & Choi, J. (2009). A cadmium toxicity assay using stress responsive *Caenorhabditis elegans* mutant strains. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.07.006>
- Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Miah, M. R., Weitz, R. L., Lawes, M. J. A., Akinyemi, A. J., Ijomone, O. M., & Aschner, M. (2018). *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 354(October 2017), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.016>
- Saeki, S., Yamamoto, M., & Iino, Y. (2001). Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology*, 204(10), 1757–1764. <https://doi.org/10.1242/JEB.204.10.1757>
- Sammi, S. R., Agim, Z. S., & Cannon, J. R. (2018). From the Cover: Harmane-Induced Selective Dopaminergic Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological Sciences*, 161(2), 335–348. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx223>
- Sánchez-Catalán, M. J., Hipólito, L., Zornoza, T., Polache, A., & Granero, L. (2009). Motor stimulant effects of ethanol and acetaldehyde injected into the posterior ventral tegmental area of rats: Role of opioid receptors. *Psychopharmacology*, 204(4), 641–653. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1495-6>
- Sanchis-segura, C., Pastor, R., & Aragon, C. M. G. (2004). Opposite effects of acute versus chronic naltrexone administration on ethanol-induced locomotion. *Behavioural Brain Research*, 153, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.11.003>
- Sanyal, S., Wintle, R. F., Kindt, K. S., Nuttley, W. M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., Bigras, E., Merzs, D. C., Hébert, T. E., Van Der Kooy, D., Schafer, W. R., Culotti, J. G., & Van Tol, H. H. M. (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal*, 23(2), 473–482. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600057>
- Saunders, J. B., Degenhardt, L., Reed, G. M., & Poznyak, V. (2019). Alcohol Use Disorders in ICD-11: Past, Present, and Future. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(8), 1617–1631. <https://doi.org/10.1111/acer.14128>

- Sawin, E. R., Ranganathan, R., & Horvitz, H. R. (2000). *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 26(3), 619–631. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81199-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81199-X)
- Schafer, W. R. (2015). Mechanosensory molecules and circuits in *C. elegans*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 467(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1574-3>
- Schafer, W. R., & Kenyon, C. J. (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. In *Nature* (Vol. 375, Issue 6526, pp. 73–78). <https://doi.org/10.1038/375073a0>
- Schreiber, M. A., & McIntire, S. L. (2011). A *Caenorhabditis elegans* p38 MAP kinase pathway mutant protects from dopamine, methamphetamine, and MDMA toxicity. *Neuroscience Letters*, 498(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.04.071>
- Schwartz, B. S., Stewart, W. F., Bolla, K. I., Simon, D., Bandeen-Roche, K., Gordon, B., Links, J. M., & Todd, A. C. (2000). Past adult lead exposure is associated with longitudinal decline in cognitive function. *Neurology*, 55(8), 1144–1150. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.8.1144>
- Scott, L. L., Davis, S. J., Yen, R. C., Ordemann, G. J., Nordquist, S. K., Bannai, D., & Pierce, J. T. (2017). Behavioral Deficits Following Withdrawal from Chronic Ethanol Are Influenced by SLO Channel Function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 206(3), 1445–1458. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193102>
- Selevan, S. G., Rice, D. C., Hogan, K. A., Euling, S. Y., Pfahles-Hutchens, A., & Bethel, J. (2003). Blood Lead Concentration and Delayed Puberty in Girls. *New England Journal of Medicine*, 348(16), 1527–1536. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020880>
- Sellings, L., Pereira, S., Qian, C., Dixon-McDougall, T., Nowak, C., Zhao, B., Tyndale, R. F., & van der Kooy, D. (2013). Nicotine-motivated behavior in *Caenorhabditis elegans* requires the nicotinic acetylcholine receptor subunits *acr-5* and *acr-15*. *European Journal of Neuroscience*, 37(5), 743–756. <https://doi.org/10.1111/ejn.12099>
- Shao, J., Zhang, X., Cheng, H., Yue, X., Zou, W., & Kang, L. (2018). Serotonergic neuron ADF modulates avoidance behaviors by inhibiting sensory neurons in *C. elegans*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 471(2), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2202-4>
- Shimizu, K., Ashida, K., Hotta, K., & Oka, K. (2019). Food deprivation changes chemotaxis behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Biophysics and Physicobiology*, 16, 167–172. https://doi.org/10.2142/biophysico.16.0_167
- Shin, N., Cuenca, L., Karthikraj, R., Kannan, K., & Colaiácovo, M. P. (2019). Assessing effects of germline exposure to environmental toxicants by high-throughput screening in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 15(2), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007975>

- Silbergeld, E. K. (1992). Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. *The FASEB Journal*, 6(13), 3201–3206. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.13.1397842>
- Silbergeld, E. K., Schwartz, J., & Mahaffey, K. (1988). Lead and osteoporosis: Mobilization of lead from bone in postmenopausal women. *Environmental Research*, 47(1), 79–94. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(88\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(88)80023-9)
- Simons, T. J. B. (1986). Cellular interactions between lead and calcium. *British Medical Bulletin*, 42(4), 431–434.
- Sippel, H. W. (1974). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 23(2), 451–452. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1974.tb04380.x>
- Smeal, T., & Guarente, L. (1997). Mechanisms of cellular senescence. *Current Opinion in Genetics & Development*, 7(2), 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(97\)80139-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(97)80139-6)
- Smit, K., Voogt, C., Hiemstra, M., Kleinjan, M., Otten, R., & Kuntsche, E. (2018). Development of alcohol expectancies and early alcohol use in children and adolescents: A systematic review. *Clinical Psychology Review*, 60(February), 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2018.02.002>
- Smith, B. R., Aragon, C. M. G., & Amit, Z. (1997). Catalase and the production of brain acetaldehyde: A possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addiction Biology*, 2(3), 277–290. <https://doi.org/10.1080/13556219772570>
- Smith, L. L., Ryde, I. T., Hartman, J. H., Romersi, R. F., Markovich, Z., & Meyer, J. N. (2019). Strengths and limitations of morphological and behavioral analyses in detecting dopaminergic deficiency in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroToxicology*, 74(July), 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.07.002>
- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: A systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiological Reviews*, 89(2), 649–705. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2008>
- Stansfield, K. H., Richard Pilsner, J., Lu, Q., Wright, R. O., & Guilarte, T. R. (2012). Dysregulation of BDNF-TrkB signaling in developing hippocampal neurons by Pb²⁺: Implications for an environmental basis of neurodevelopmental disorders. *Toxicological Sciences*, 127(1), 277–295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs090>
- Sterken, M. G., van Wijk, M. H., Quamme, E. C., Riksen, J. A. G., Carnell, L., Mathies, L. D., Davies, A. G., Kammenga, J. E., & Bettinger, J. C. (2021). Transcriptional analysis of the response of *C. elegans* to ethanol exposure. *Scientific Reports*, 11(1), 10993. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90282-8>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 44(8), 085201. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Stokes, A. H., Hastings, T. G., & Vrana, K. E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Journal*

- of Neuroscience Research*, 55(6), 659–665. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990315\)55:6<659::AID-JNR1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990315)55:6<659::AID-JNR1>3.0.CO;2-C)
- Strange, K. (2006). An Overview of *C. elegans* Biology. In *C. elegans* (Vol. 351, pp. 1–12). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-151-7:1>
- Sugiura, M., Fuke, S., Suo, S., Sasagawa, N., Van Tol, H. H. M., & Ishiura, S. (2005). Characterization of a novel D2-like dopamine receptor with a truncated splice variant and a D1-like dopamine receptor unique to invertebrates from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry*, 94(4), 1146–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03268.x>
- Sulston, J., Dew, M., & Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 215–226. <https://doi.org/10.1002/cne.901630207>
- Sulston, J., & Hodgkin, J. (1988). The nematode *Caenorhabditis elegans*. Ed. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 587–606.
- Sun, A. Y., Ingelman-Sundberg, M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S. M., Patel, V. B., Cunningham, C. C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nespore, K., & Sun, G. Y. (2001). Ethanol and Oxidative Stress. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(s1), 237S–243S. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02402.x>
- Sun, L., Wu, Q., Liao, K., Yu, P., Cui, Q., Rui, Q., & Wang, D. (2016). Contribution of heavy metals to toxicity of coal combustion related fine particulate matter (PM_{2.5}) in *Caenorhabditis elegans* with wild-type or susceptible genetic background. *Chemosphere*, 144, 2392–2400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.028>
- Suo, S., Culotti, J. G., & Van Tol, H. H. M. (2009). Dopamine counteracts octopamine signalling in a neural circuit mediating food response in *C. elegans*. *EMBO Journal*, 28(16), 2437–2448. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.194>
- Suo, S., Ishiura, S., & Van Tol, H. H. M. (2004). Dopamine receptors in *C. elegans*. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3 SPEC. ISS.), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.021>
- Suszkowiak, J. B. (2004). Presynaptic disruption of transmitter release by lead. *NeuroToxicology*, 25(4 SPEC. ISS.), 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2003.09.009>
- Szumliński, K. K., Diab, M. E., Friedman, R., Henze, L. M., Lominac, K. D., & Bowers, M. S. (2007). Accumbens neurochemical adaptations produced by binge-like alcohol consumption. *Psychopharmacology*, 190(4), 415–431. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0641-7>
- Tabakoff, B., & Hoffman, P. L. (2013). The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: An integrative history. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 113, 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.009>

- Talbot, A., Lippiatt, C., & Tantry, A. (2018). Lead in a case of encephalopathy. *BMJ Case Reports*, 2018, bcr-2017-222388. <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-222388>
- Tavakoli-Nezhad, M., Barron, A. J., & Pitts, D. K. (2001). Postnatal inorganic lead exposure decreases the number of spontaneously active midbrain dopamine neurons in the rat. *NeuroToxicology*, 22(2), 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(01\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(01)00010-9)
- Tawa, E. A., Hall, S. D., & Lohoff, F. W. (2016). Overview of the Genetics of Alcohol Use Disorder. *Alcohol and Alcoholism*, 51(5), 507–514. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw046>
- Taylor, M. P., Forbes, M. K., Opeskin, B., Parr, N., & Lanphear, B. P. (2016). The relationship between atmospheric lead emissions and aggressive crime: An ecological study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0122-3>
- Tejeda-Benitez, L., & Olivero-Verbel, J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology Article in Reviews of environmental contamination and toxicology (Vol. 237, Issue November). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8>
- Theron, A., Tintinger, G., & Anderson, R. (2012). Harmful Interactions of Non-Essential Heavy Metals with Cells of the Innate Immune System. *Journal of Clinical Toxicology*, s3(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-005>
- Tiwari, S. S., Tambo, F., & Agarwal, R. (2020). Assessment of lead toxicity on locomotion and growth in a nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied and Natural Science*, 12(1), 36–41. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i1.2227>
- Topper, S. M., Aguilar, S. C., Topper, V. Y., Elbel, E., & Pierce-Shimomura, J. T. (2014). Alcohol disinhibition of behaviors in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092965>
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12(3–4), 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- Vallone, D., Picetti, R., & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00063-9)
- Van Thiel, D. H., & Gavalier, J. S. (1990). Endocrine consequences of alcohol abuse. *Alcohol and Alcoholism*, 25(4), 341–344. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045013>
- VanDuyn, N., Settivari, R., Wong, G., & Nass, R. (2010). SKN-1/Nrf2 inhibits dopamine neuron degeneration in a *Caenorhabditis elegans* model of methylmercury toxicity. *Toxicological Sciences*, 118(2), 613–624. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq285>
- Vaziri, N. D., & Gonick, H. C. (2008). Cardiovascular effects of lead exposure. *The Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 426–435.

- <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt1v83j79q/qt1v83j79q.pdf?t=nc65jt>
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., & Spanagel, R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology*, *154*(2), 299–315. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.30>
- Verstraeten, S. V., Aimo, L., & Oteiza, P. I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Archives of Toxicology*, *82*(11), 789–802. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0345-3>
- Vidal-Gadea, A. G., Davis, S., Becker, L., & Pierce-Shimomura, J. T. (2012). Coordination of behavioral hierarchies during environmental transitions in *Caenorhabditis elegans*. *Worm*, *1*(1), 5–11.
- Vidal-Gadea, A. G., & Pierce-Shimomura, J. T. (2012). Conserved role of dopamine in the modulation of behavior. *Communicative and Integrative Biology*, *5*(5), 440–447. <https://doi.org/10.4161/cib.20978>
- Vigeh, M., Smith, D. R., & Hsu, P.-C. (2011). How does lead induce male infertility? *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *9*(1), 1–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356074>
- Vij, A. G. (2009). Hemopoietic, Hemostatic and Mutagenic Effects of Lead and Possible Prevention by Zinc and Vitamin C. *Al Ameen J Med S Ci*, *2*, 27–36.
- Virgolini, Miriam B., Mattalloni, M. S., Albrecht, P. A., Deza-Ponzio, R., & Cancela, L. M. (2017). Modulation of ethanol-metabolizing enzymes by developmental lead exposure: Effects in voluntary ethanol consumption. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*(May), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00095>
- Virgolini, Miriam B., Mattalloni, M. S., Deza-Ponzio, R., Albrecht, P. A., & Cancela, L. M. (2019). Lead Exposure and Ethanol Intake: Oxidative Stress as a Converging Mechanism of Action. In *Neuroscience of Alcohol* (pp. 515–525). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813125-1.00053-2>
- Virgolini, Miriam B., Volosin, M., Fulginiti, A. ., & Cancela, L. . (2004). Amphetamine and stress responses in developmentally lead-exposed rats. *Neurotoxicology and Teratology*, *26*(2), 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.11.001>
- Virgolini, Miriam B, & Cancela, L. M. (2014). Exposición a plomo y adicción a drogas. *Rev. Farmacol. Chile*, *7*(5016), 26–38.
- Virgolini, Miriam B, Cancela, L. M., & Fulginiti, S. (1999). Behavioral Responses to Ethanol in Rats Perinatally Exposed to Low Lead Levels. *Neurotoxicology and Teratology*, *21*(5), 551–557. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00020-3)
- Virgolini, Miriam Beatriz, & Aschner, M. (2021). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. In *Neurotoxicity of Metals: Old Issues and New Developments* (1st ed., Vol. 5). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.11.002>

- Volkow, N. D., & Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 963–970. <https://doi.org/10.1038/nrn1539>
- Vorvolakos, T., Arseniou, S., & Samakouri, M. (2016). There is no safe threshold for lead exposure: A literature review. *Psychiatriki*, 27(3), 204–214. <https://doi.org/10.22365/jpsych.2016.273.204>
- Waggoner, L. E., Dickinson, K. A., Poole, D. S., Tabuse, Y., Miwa, J., & Schafer, W. R. (2000). Long-Term Nicotine Adaptation in *Caenorhabditis elegans* Involves PKC-Dependent Changes in Nicotinic Receptor Abundance. *The Journal of Neuroscience*, 20(23), 8802–8811. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08802.2000>
- Wang, D. (2019). Avoidance Behavior of Nematodes to Environmental Toxicants or Stresses. In *Target Organ Toxicology in Caenorhabditis elegans*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6010-7_2
- Wang, D., Shen, L., & Wang, Y. (2007). The phenotypic and behavioral defects can be transferred from zinc-exposed nematodes to their progeny. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.05.009>
- Wang, D., & Xing, X. (2008). Assessment of locomotion behavioral defects induced by acute toxicity from heavy metal exposure in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences*, 20(9), 1132–1137. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62160-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62160-9)
- Wang, D., & Xing, X. (2009). Pre-treatment with mild metal exposure suppresses the neurotoxicity on locomotion behavior induced by the subsequent severe metal exposure in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.07.008>
- Wang, D., & Yang, P. (2007). Multi-biological defects caused by lead exposure exhibit transferable properties from exposed parents to their progeny in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences*, 19(11), 1367–1372. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60223-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60223-X)
- Ward, A., Walker, V. J., Feng, Z., & Xu, X. Z. S. (2009). Cocaine modulates locomotion behavior in *C. elegans*. *PLoS ONE*, 4(6), 4–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005946>
- Ward, S. (1973). Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 817–821. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.817>
- Weinshenker, D., Garriga, G., & Thomas, J. H. (1995). Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6975–6985. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-10-06975.1995>
- Wen, J. Y. M., Kumar, N., Morrison, G., Rambaldini, G., Runciman, S., Rousseau, J., & van der Kooy, D. (1997). Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. *Behavioral Neuroscience*, 111(2),

- 354–368. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.111.2.354>
- White, J. , Southgate, E., Thomson, J. ., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *314*, 1–340.
- White, L. D., Cory-Slechta, D. A., Gilbert, M. E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N. H., Virgolini, M., Rossi-George, A., Lasley, S. M., Qian, Y. C., & Basha, M. R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *225*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.001>
- Williams, L., & Dusenbery, D. B. (1990). Aquatic toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Environmental Protection Agency Society*, *9*, 1285–1290.
- Williams, P. L., & Dusenbery, D. B. (1988). Using the nematode *caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicology and Industrial Health*, *4*(4), 469–478. <https://doi.org/10.1177/074823378800400406>
- Williamson, V. M., Long, M., & Theodoris, G. (1991). Isolation of *Caenorhabditis elegans* mutants lacking alcohol dehydrogenase activity. *Biochemical Genetics*, *29*(7–8), 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF00554139>
- Wise, R. A., & Koob, G. F. (2014). The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, *39*(2), 254–262. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Wolf, F. W., & Heberlein, U. (2003). Invertebrate models of drug abuse. *Journal of Neurobiology*, *54*(1), 161–178. <https://doi.org/10.1002/neu.10166>
- World Health Organization. (1992). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders : clinical descriptions and diagnostic guidelines*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2010). *Childhood lead poisoning*. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/who-136571>
- World Health Organization. (2018). Informe sobre la situación mundial del alcohol y la salud. *Organización Panamericana de La Salud*, *28*. http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/51352/OPSNMH19012_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- WormBase : Nematode Information Resource*. 2020. <https://wormbase.org/#012-34-5>
- Wu, Q., Liu, P., Li, Y., Du, M., Xing, X., & Wang, D. (2012). Inhibition of ROS elevation and damage to mitochondrial function prevents lead-induced neurotoxic effects on structures and functions of AFD neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Environmental Sciences*, *24*(4), 733–742. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60835-8](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60835-8)

- Wu, Z.-Q., Li, K., Ma, J.-K., & Li, Z.-J. (2019). Effects of ethanol intake on anti-oxidant responses and the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 288–296. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1564794>
- Wu, Z.-Q., Li, K., Tian, X., Zhou, M.-X & Li, Z.-J. (2020). *Schisandra chinensis* water extract protects ethanol-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13249>
- Xiao, C., Zhang, J., Krnjević, K., & Ye, J. H. (2007). Effects of ethanol on midbrain neurons: Role of opioid receptors. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31(7), 1106–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00405.x>
- Xiao, G., Chen, H., Krasteva, N., Liu, Q., & Wang, D. (2018). Identification of interneurons required for the aversive response of *Caenorhabditis elegans* to graphene oxide. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0373-y>
- Xie, G., Hipólito, L., Zuo, W., Polache, A., Granero, L., Krnjevic, K., & Ye, J.-H. (2012). Salsolinol stimulates dopamine neurons in slices of posterior ventral tegmental area indirectly by activating μ -opioid receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1), 43–50. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.186833>
- Xing, X. J., Rui, Q., Du, M., & Wang, D. Y. (2009a). Exposure to lead and mercury in young larvae induces more severe deficits in neuronal survival and synaptic function than in adult nematodes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(4), 732–741. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9307-x>
- Xing, X., Rui, Q., & Wang, D. (2009b). Lethality toxicities induced by metal exposure during development in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(4), 530–536. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9816-3>
- Yan, Q. S., Reith, M. E. A., Yan, S. G., & Jobe, P. C. (1998). Effect of systemic ethanol on basal and stimulated glutamate releases in the nucleus accumbens of freely moving Sprague-Dawley rats: A microdialysis study. *Neuroscience Letters*, 258(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00840-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00840-4)
- Ye, H., Ye, B., & Wang, D. (2008). Trace administration of vitamin E can retrieve and prevent UV-irradiation- and metal exposure-induced memory deficits in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.12.001>
- Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., & Ishihara, T. (2012). Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nature Communications*, 3, 711–739. <https://doi.org/10.1038/ncomms1750>
- Young, A. T., Ly, K. N., Wilson, C., Lehnert, K., Snell, R. G., Reid, S. J., & Jacobsen, J. C. (2018). Modelling brain dopamine-serotonin vesicular transport disease in *Caenorhabditis elegans*. *DMM Disease*

- Models and Mechanisms*, 11(11). <https://doi.org/10.1242/dmm.035709>
- Yu, Z. Y., Chen, X. X., Zhang, J., Wang, R., & Yin, D. Q. (2013). Transgenerational effects of heavy metals on L3 larva of *Caenorhabditis elegans* with greater behavior and growth inhibitions in the progeny. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.012>
- Yu, Z. Y., Zhang, J., & Yin, D. Q. (2016). Multigenerational effects of heavy metals on feeding, growth, initial reproduction and antioxidants in *caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 11(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154529>
- Zakhari, S. (2006). Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research and Health*, 29(4), 245–254.
- Zhang, X. L., Guariglia, S. R., McGlothan, J. L., Stansfield, K. H., Stanton, P. K., & Guilarte, T. R. (2015). Presynaptic mechanisms of lead neurotoxicity: Effects on vesicular release, vesicle clustering and mitochondria number. *PLoS ONE*, 10(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127461>
- Zhang, Y. M., Liu, X. Z., Lu, H., Mei, L., & Liu, Z. P. (2009). Lipid peroxidation and ultrastructural modifications in brain after perinatal exposure to lead and/or cadmium in rat pups. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(5), 423–429. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60021-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60021-9)
- Zhang, Y., Ye, B., & Wang, D. (2010). Effects of metal exposure on associative learning behavior in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(1), 129–136. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9456-y>
- Zhao, Y. L., & Wang, D. Y. (2012). Formation and regulation of adaptive response in nematode *caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/564093>
- Zhu, G., Zhang, F., & Li, W. (2014). Nematodes feel a craving - Using *Caenorhabditis elegans* as a model to study alcohol addiction. *Neuroscience Bulletin*, 30(4), 595–600. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1451-7>
- Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., Mahaffey, K. R., & Fomon, S. J. (1978). Absorption and Retention of Lead by Infants. *Pediatric Research*, 12(1), 29–34. <https://doi.org/10.1203/00006450-197801000-00008>
- Zimatkin, S. M. (1991). Histochemical Study of Aldehyde Dehydrogenase in the Rat CNS. *Journal of Neurochemistry*, 56(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02555.x>
- Zimatkin, S. M., Liopo, A. V., & Deitrich, R. A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(8), 1623–1627. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03958.x>

- Zimatkin, S. M., Pronko, S. P., Vasiliou, V., Gonzalez, F. J., & Deitrich, R. A. (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *30*(9), 1500–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00181.x>
- Zurich, M. G., Eskes, C., Honegger, P., Bérode, M., & Monnet-Tschudi, F. (2002). Maturation-dependent neurotoxicity of lead acetate in vitro: Implication of glial reactions. *Journal of Neuroscience Research*, *70*(1), 108–116. <https://doi.org/10.1002/jnr.10367>