



---

**ROL DE CATALASA CEREBRAL Y LA  
FORMACION DE ACETALDEHIDO SOBRE LAS  
PROPIEDADES MOTIVACIONALES DE  
ETANOL EN RATAS EXPUESTAS  
PERINATALMENTE A PLOMO.**

---

**Biol. Mara S. Mattalloni**

**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Farmacología**

**IFEC CONICET**

**Argentina 2016**



# ÍNDICE TEMÁTICO:

Resumen.....	6
Objetivo general y específicos.....	10
<u>Capítulo I:</u> “ <i>Rol de la enzima CAT (catalasa) en animales expuestos perinatalmente a plomo: implicancias en respuestas antioxidantes y en el metabolismo de ETOH (etanol)</i> ”.....	13
<u>Marco teórico</u> .....	14
Plomo: como contaminante ambiental a bajas concentraciones.....	14
Distribución del plomo en el organismo.....	16
Plomo: como neurotóxico del desarrollo.....	17
Plomo, estrés y drogas de abuso .....	18
Plomo y etanol: ¿existe un sitio de acción en común?.....	21
Catalasa como enzima antioxidante.....	22
Metabolismo periférico del Etoh.....	26
Catalasa en el metabolismo de Etoh.....	28
Catalasa y la hipótesis del ACD en las conductas inducidas por Etoh.....	30
Vía de la CAT como sitio común en la interacción entre Etoh y Pb.....	35
<u>Materiales y Métodos</u> .....	38
Drogas y reactivos.....	38
Inhibidores de CAT: 3-amino-1, 2,4 triazol (AT).....	38
Activadores de CAT: Acido 3 nitropropiónico (3NPA).....	40
Animales y tratamiento perinatal: protocolo de exposición al Pb.....	42
Niveles de Pb en sangre.....	43
Hemoglobina en sangre.....	44
Consumo voluntario de Etoh.....	44
Raciocinio.....	44
Procedimiento.....	44
Curva dosis/respuesta de 3NPA.....	48
Consumo de sacarosa.....	49
Actividad locomotora.....	50
Raciocinio.....	50
Procedimiento.....	50
Alcoholemia.....	51
Actividad de CAT.....	52
Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo.....	53
Raciocinio.....	53

Procedimiento.....	53
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	54
<b><u>Resultados</u></b> .....	55
Parámetros del modelo de exposición al Pb.....	55
Niveles de Pb en sangre.....	55
Hemoglobinemia.....	56
Consumo voluntario de Etanol en respuesta a AT.....	57
Consumo basal.....	58
Administración de AT.....	58
Consumo voluntario de Etanol en respuesta a 3NPA.....	60
Consumo basal.....	61
Administración 3NPA.....	61
Curva dosis/respuesta de 3NPA.....	63
Administración crónica de 3NPA a una dosis de 10 mg/kg.....	63
Administración crónica de 3NPA a una dosis de 30 mg/kg.....	63
Consumo de sacarosa.....	65
Actividad locomotora.....	66
Alcoholemia.....	68
Actividad de CAT.....	68
Actividad enzimática de CAT en sangre.....	68
Actividad de CAT en sangre: experimentos piloto para determinar la dosis y el tiempo de administración de 3NPA.....	69
Actividad de CAT cerebral: Experimentos piloto para determinar la dosis y el tiempo de administración de 3NPA.....	70
Actividad enzimática de CAT en cerebro.....	72
Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo.....	75
<b><u>Discusión y conclusiones parciales</u></b> .....	77
<b><u>Capítulo II: “Evaluación de la abundancia relativa de CAT cerebral al final del esquema de consumo voluntario de etanol en condiciones basales y en respuesta a manipulaciones farmacológicas de la enzima”</u></b> .....	84
<b><u>Marco teórico</u></b> .....	85
<b><u>Materiales y Métodos</u></b> .....	87
Obtención de las muestras y procedimiento.....	87
Inmunohistoquímica de Catalasa: recuperación antigénica.....	89
Cuantificación de células positivas para CAT.....	89
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	91
<b><u>Resultados</u></b> .....	91

Efecto de la edad posnatal sobre la expresión de CAT.....	91
Efecto del tratamiento de AT y 3NPA durante el consumo voluntario de Etoh sobre la expresión de CAT.....	92
<b><u>Discusión y conclusiones parciales</u></b> ..	105
<b><u>Capítulo III: “Consecuencia de la microinfusión de vectores lentivirales shRNA anticatalasa para en área tegmento”</u></b> .....	108
<b><u>Marco teórico</u></b> .....	109
Especificidad en la modulación enzimática del metabolismo de Etoh.....	109
Vectores virales: lentivirus.....	110
Silenciamiento génico postranscripcional.....	112
Circuito de motivación y recompensa: circuito mesocorticolímbico y área tegmental ventral.	113
<b><u>Materiales y Métodos</u></b> .....	117
Generación de vectores lentivirales antiCAT.....	117
Plásmidos utilizados.....	117
Plásmidos: identificación y confirmación.....	118
Cultivos de células embrionarias humanas de riñón HEK293T.....	119
Transfección de células HEK293T con pCAT.....	119
Generación de lentivirus: Transfección de células HEK293T con los plásmidos pshRNAantiCAT, pVSVG y pdelta8,9.....	121
Titulación de los vectores.....	121
Administración intracerebral en ATV con vectores lentivirales.....	122
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	123
<b><u>Resultados</u></b> .....	124
Titulación de los vectores virales.....	124
Identificación y confirmación de los plásmidos.....	124
Determinación de la actividad de CAT.....	127
Consumo voluntario de Etanol.....	128
Administración del vector lentiviral previo a la fase de adquisición del consumo de Etoh.....	128
Administración del vector lentiviral en el día 21 del esquema de consumo voluntario.....	130
Consumo basal.....	130
Consumo en respuesta a la administración del vector lentiviral.....	131
<b><u>Discusión y conclusiones parciales</u></b> .....	133
<b><u>Capítulo IV: “Evaluación de las propiedades motivacionales de Etoh en un paradigma de autoadministración oral en cajas de Skinner”</u></b> .....	137
<b><u>Marco teórico</u></b> .....	138
Reforzamiento.....	138
Modelos de autoadministración de Etoh en animales.....	139

Conducta apetitiva y consumatoria.....	143
Evidencias del estudio del metabolismo de Etoh por conducta operante.....	145
<b><u>Materiales y Métodos</u></b> .....	148
Autoadministración de Etoh.....	148
Manipulaciones farmacológicas: administración de AT y 3NPA.....	150
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	150
<b><u>Resultados</u></b> .....	151
Autoadministración de etanol.....	151
Shaping.....	151
Fading.....	152
Determinación del Break point o punto de quiebre.....	153
Manipulaciones farmacológicas: administración de AT y 3NPA.....	155
Shaping.....	155
Fading.....	156
Adquisición de autoadministración de Etoh.....	158
Administración de AT y 3NPA (Basal).....	158
Administración de AT y 3NPA.....	158
<b><u>Discusión y conclusiones parciales</u></b> .....	163
<b><u>Capítulo V: “Participación de la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) en los efectos motivacionales del etanol”</u></b> .....	166
<b><u>Marco teórico</u></b> .....	167
Rol de ALDH2 y su rol en el metabolismo periférico y central del Etoh.....	167
Genética del alcoholismo: aldehído deshidrogenasa y su polimorfismo isoenzimático.....	169
Aproximaciones farmacológicas orientadas a la inhibición de ALDH2.....	172
<b><u>Materiales y Métodos</u></b> .....	176
Drogas y reactivos.....	176
Cianamida (CIAN).....	176
Consumo voluntario de Etoh.....	179
Actividad locomotora.....	183
Actividad enzimática de ALDH2.....	183
Actividad enzimática de CAT.....	184
<b><u>Análisis estadístico</u></b> .....	184
<b><u>Resultados</u></b> .....	185
Consumo voluntario de Etanol.....	185
Administración sistémica de CIAN.....	185
Actividad locomotora.....	187
Consumo voluntario de Etanol.....	189

Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,3 mg).....	189
Actividad locomotora.....	191
Consumo voluntario de Etanol.....	192
Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,2 mg).....	192
Actividad locomotora.....	194
Consumo voluntario de Etanol.....	195
Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,1 mg).....	195
Actividad locomotora.....	197
Actividad enzimática de ALDH2.....	198
Actividad enzimática de catalasa.....	201
<u>Discusión y conclusiones parciales</u> .....	207
<u>Conclusiones y discusiones finales</u> .....	212
<u>Bibliografía</u> .....	214

# RESUMEN



## RESUMEN

Existen evidencias bioquímicas, farmacológicas y conductuales que apoyan la existencia de una interacción entre Pb y ETOH. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la exposición perinatal a Pb aumenta la reactividad a los efectos ansiolíticos y motivacionales de ETOH en crías periadolescentes.

El **plomo (Pb)** es un neurotóxico capaz de producir un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes, entre las que se encuentra **Catalasa (CAT)**, probablemente como un mecanismo compensatorio de detoxificación, ante un flujo exagerado de  $H_2O_2$  (**peróxido de hidrógeno**). CAT, además de encontrarse implicada en el sistema de remoción de EROs (especies reactivas de oxígeno), es responsable de la oxidación de ETOH a **acetaldehído (ACD)**, principalmente a nivel cerebral. Usando manipulaciones que permiten alterar el metabolismo del ETOH, se ha demostrado que varios de sus efectos conductuales reforzantes positivos serían mediados por ACD a nivel central. Cabe destacar que los efectos reforzantes positivos de ACD en el SNC se contraponen a sus efectos en la periferia, donde es conocido por sus propiedades aversivas, responsables de disuadir al consumo de ETOH.

En relación a esto, en el presente trabajo de tesis doctoral se propuso evaluar el impacto que es capaz de ejercer la exposición durante el desarrollo y la lactancia a un contaminante ambiental y teratógeno como es el Pb sobre el patrón de consumo/ autoadministración de una droga de abuso, en este caso el ETOH, focalizándonos en la CAT y la formación de ACD como un sitio común de interacción entre ambos.

Los principales hallazgos obtenidos permitieron demostrar que la exposición perinatal a Pb durante la gestación y la lactancia promovió un mayor consumo voluntario de ETOH (asociado a una mayor locomoción la cual fue evaluada inmediatamente después) y un aumento de la autoadministración oral de la droga. La inhibición de la actividad de CAT fue capaz de reducir este consumo, en tanto que la activación enzimática de la misma lo aumentó, cambios conductuales que se correlacionaron con cambios en la actividad enzimática de CAT tanto en sangre como a nivel cerebral. Por otra parte, la microinyección del lentivirus shRNA antiCAT en ATV impidió que los animales expuestos a Pb manifestarán un mayor consumo voluntario de ETOH y, más aún, cuando el vector lentiviral fue administrado en animales que habían adquirido un patrón estable de consumo de ETOH se pudo observar también como la

inhibición de la expresión de CAT redujo el consumo voluntario del mismo, alcanzando valores similares a los controles.

Además, la inmunomarcación de la proteína de CAT demostró que la enzima presenta una expresión selectiva en determinadas áreas cerebrales, con un patrón diferencial de acuerdo a la edad postnatal y el tratamiento que recibieron (AT, 3NPA). Estos resultados aportan evidencias que la mayor expresión de la enzima en los animales expuestos a Pb se encuentra circunscripta a determinadas áreas cerebrales, las que podrían representar zonas de mayor acumulación de ACD.

Por último, la administración sistémica de CIAN (inhibidor de ALDH2-enzima responsable de la metabolización de ACD) redujo el consumo de ETOH (y la hiperlocomoción inducida por el ETOH consumido) en animales expuestos a Pb. Mientras que, de manera opuesta, se observó un mayor consumo de ETOH y una mayor actividad locomotora como consecuencia de este consumo cuando CIAN fue administrada a nivel cerebral. La actividad de la enzima ALDH2 se vio inhibida en hígado, pero de manera interesante no en cerebro cuando CIAN fue administrada sistémicamente, indicando que los efectos que se observaron estarían circunscriptos a la periferia. Por el contrario, cuando la droga fue administrada en cerebro se observó una inhibición en la actividad de ALDH2 selectivamente en los animales controles, los cuales evidenciaron un aumento de manera más abrupta en el consumo de ETOH. Estos datos demuestran de manera indirecta efectos opuestos de la acumulación periférica y central de ACD, a través de la inhibición de la enzima responsable de su metabolización.

En conclusión, los cambios conductuales observados, que se encuentran correlacionados con cambios en los niveles de actividad de las enzimas responsables, tanto de la generación como de la metabolización de ACD (CAT y ALDH2), serían indicadores de diferencias en las propiedades motivacionales y estimulantes de ETOH en animales expuestos al Pb. Así, principalmente CAT jugaría un rol crítico al catalizar la formación de ACD cerebral cuyas propiedades reforzantes podrían ser mayores en animales expuestos a Pb y condicionar el mayor consumo voluntario de ETOH. Por todo lo expuesto, los resultados obtenidos por este trabajo de tesis aportan evidencias del rol de CAT y ALDH, e indirectamente de la acumulación del ACD, en la autoadministración de ETOH (consumo voluntario y autoadministración operante), siendo la exposición al Pb una variable clave en las alteraciones farmacológicas y conductuales encontradas en estos animales. Así, hemos demostrado la importancia del

impacto de la exposición temprana a un toxico ambiental, el Pb, en las conductas futuras del organismo en formación reflejadas en este caso en la modulación de patrones de ingesta y preferencia de ETOH, condicionando así una mayor vulnerabilidad a la adquisición de conductas relacionadas al abuso de drogas, particularmente etanol.



## HIPOTESIS

En base a evidencias propias y de otros autores, postulamos que CAT sería un sitio de acción común entre Pb (que induciría su activación a partir de la mayor producción de especies reactivas oxigenadas) y ETOH (que sería metabolizado por la enzima en cerebro a ACD).

## OBJETIVOS

Por lo tanto, considerando evidencias previas en relación a la mayor susceptibilidad a efectos ansiolíticos y motivacionales de ETOH en animales perinatalmente expuestos a plomo (Pb), manifestándose como un mayor consumo voluntario en un paradigma de libre elección ETOH/agua, nos propusimos:

### Objetivo general:

*Evaluar los posibles mecanismos neurobiológicos comunes en la interacción entre la exposición a plomo durante el desarrollo perinatal en ratas y el consumo de ETOH en la etapa periadolescente, focalizándose en el rol de la enzima CAT como sitio de acción común entre Pb (desde la perspectiva redox) y ETOH (desde el punto de vista metabólico).*

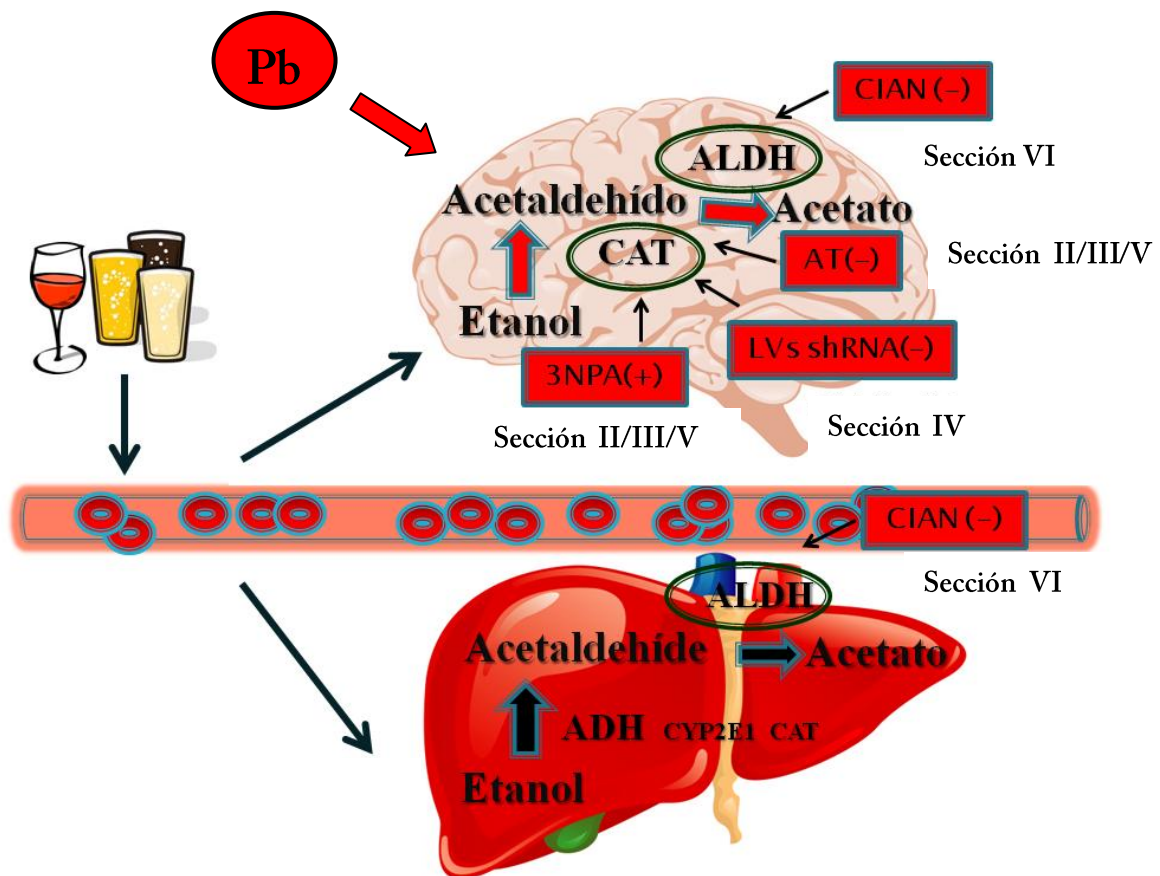
*Así, el objetivo principal de esta tesis fue estudiar la acumulación de ACD en cerebro mediante la modulación de la actividad de las enzimas CAT y ALDH en las conductas inducidas por el ETOH en animales expuestos a Pb durante el desarrollo.*

**Específicamente** en animales periadolescentes controles y expuestos a 220 ppm Pb se proponen como objetivos específicos:

- I: el análisis de parámetros bioquímicos en el modelo de exposición a plomo durante la gestación y lactancia.
- II: la determinación de la actividad de CAT ante diferentes manipulaciones farmacológicas y su correlación con el consumo voluntario de ETOH.
- III: la determinación de la abundancia relativa de CAT cerebral al final del esquema de consumo voluntario de etanol (y ante diferentes manipulaciones farmacológicas).
- IV: el registro del consumo de ETOH en área tegmento ventral (ATV) en respuesta a vectores lentivirales pshRNA antiCAT microinyectados en ATV

- V: el estudio de las propiedades reforzantes de ETOH mediante la evaluación de la autoadministración oral en cajas de skinner
- VI: la evaluación del efecto de la inhibición de la actividad de ALDH con la resultante acumulación de ACD central sobre los efectos motivacionales y estimulantes del etanol.

A los fines de facilitar la interpretación el siguiente esquema resume las diferentes manipulaciones que se realizaron en el presente trabajo de tesis y las secciones en los que han sido abordados los objetivos:



**Figura 1:** Resumen del abordaje experimental realizado en este trabajo de tesis. Signos (+) ó (-) indican potenciación o inhibición enzimática respectivamente.



Capítulo I: *“Rol de la enzima CAT en animales expuestos perinatalmente a plomo: implicancias en respuestas antioxidantes y en el metabolismo de ETOH”*



## Capítulo I: “Rol de la enzima CAT en animales expuestos perinatalmente a plomo: implicancias en respuestas antioxidantes y en el metabolismo de ETOH”.

### Marco teórico:

#### *Plomo como contaminante ambiental a bajas concentraciones en sangre*

El Pb (plomo) es un metal que no cumple ninguna función esencial conocida para el organismo, por el contrario es altamente tóxico para el mismo. Si bien la mayoría de sus aplicaciones en la actualidad han sido prohibidas, todavía persiste en el aire ambiental de grandes ciudades o zonas industrializadas como consecuencia de su utilización en el pasado en naftas y otras aplicaciones industriales. En el organismo produce numerosos efectos tóxicos en los diferentes órganos y sistemas dependiendo del nivel de exposición y de la duración del mismo (Gulson y cols, 1997a). Afecta los sistemas hematopoyético, renal, hepático, cardiovascular y reproductivo, observándose los efectos adversos más importantes sobre el SNC (sistema nervioso central), principalmente cuando la exposición se produce durante el desarrollo tanto en seres humanos (Tong y Lam, 1998; Moline y cols, 2000; Berglund y cols, 2000; Kaul y cols, 2000) como en animales de experimentación (Tiffany-Castiglioni y cols, 1989).

A lo largo de los años, los niveles de Pb en sangre en organismo en desarrollo que se consideraban aceptables han sido modificados y reducidos, a medida que los conocimientos sobre los trastornos que produce este metal se han ampliado. Esta sostenida reducción en los niveles de referencia de Pb sanguíneos en la población infantil, manifiesta una creciente preocupación por los efectos que se producen ante bajos niveles de exposición en organismos en desarrollo. En la actualidad los CDC (Centros de Control de Enfermedades de Estados Unidos) aconsejan niveles de Pb en sangre por debajo de los 5 µg/dl en niños. Estos niveles fueron revisados recientemente (“Forum CDC Updates Guidelines for Children’s Lead Exposure”, 2012) y revelan una tendencia descendente a lo largo de los años, desde un valor de 60 µg/dl (1960), 40 µg/dl (1971), 30 µg/dl (1975), 25 µg/dl (1985), 15 µg/dl (1990), y 10 µg/dl (1991) (como puede observarse en la figura 2). Además se ha recomendado eliminar la

utilización de la expresión “nivel de preocupación de Pb en sangre”, basándose en la evidencia que aún niveles muy bajos de este metal en niños se han asociado con problemas conductuales relacionados con déficit atencional y de bajo rendimiento académico, argumentando que no existe ningún nivel de Pb en sangre en niños que sea considerado seguro. Por todo esto la OMS ha decidido incluir al Pb dentro de una lista de diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública que exigen la intervención para proteger la salud tanto de trabajadores como de niños y mujeres en edad fecunda.

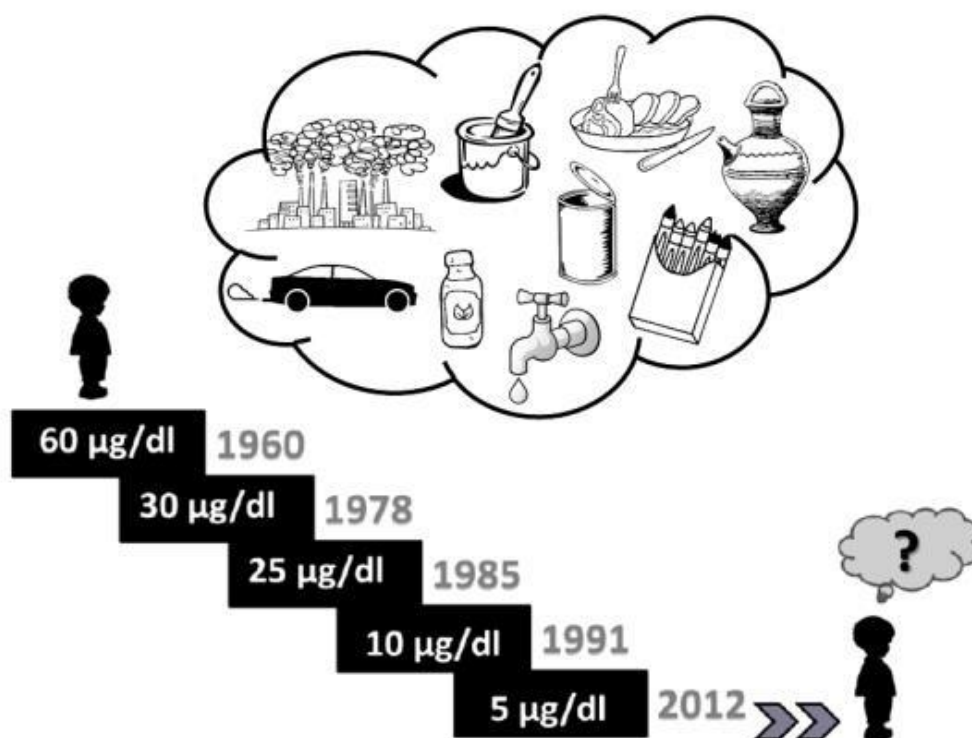


Figura 2: Fuentes de exposición y descenso a través de los años de los niveles “de referencia” de Pb en sangre en niños establecidos por los CDC. (Extraída de Mattalloni y cols, 2014).

Resulta interesante mencionar que en Córdoba como resultado de un trabajo publicado por nuestro laboratorio se determinó que en el año 1999 el 26% de la población infantil (entre 6 meses y 9 años de edad) contenía niveles de Pb en sangre superiores a 10 µg/dl (Hansen y cols, 1999). Posteriormente, en el 2013 en otro trabajo reportamos una reducción sustancial de la exposición al Pb en la población infantil puesto que solo el 3,7% de los niños presentaron plombemias superiores a 10 µg/dl. Sin embargo, ante la modificación y reducción de los niveles considerados seguros que se

produjo en el año 2012 por los CDC, el porcentaje de la población pediátrica expuesta a niveles no seguros de Pb es aún mayor alcanzando el 16,8% (Martinez y cols, 2013).

En resumen, a pesar de las políticas que intentan reducir y restringir las fuentes de contaminación de este metal y debido a su capacidad de acumularse permanentemente en el ambiente, la contaminación ambiental con Pb constituye un problema para la salud pública mundial y una preocupación para la comunidad científica internacional. Si bien en la actualidad los episodios de intoxicación aguda son poco frecuentes, la atención está centrada en los efectos tóxicos que produce la exposición crónica, lo que conlleva a consecuencias sutiles pero determinantes en el desarrollo de un organismo (Cory-Slechta y cols, 1994).

### *Distribución del plomo en el organismo*

El Pb puede ingresar al organismo por vía digestiva, respiratoria y en menor medida por vía dérmica, siendo la vía más frecuente de exposición la digestiva. Las partículas del metal son ingeridas través de las manos, alimentos o bebidas contaminadas.

Una vez que el Pb ingresa al organismo se distribuye a la sangre, donde se produce un intercambio dinámico entre diferentes compartimentos. Este metal tiene una alta afinidad por los eritrocitos por lo que un 95% de la fracción circulante se une a ellos y permanece en sangre durante aproximadamente 30 días antes de ser distribuido a tejidos blandos como cerebro, hígado y riñón donde se acumula aproximadamente por 40 días. Posteriormente se almacena en huesos y tejidos duros, sustituyendo al  $\text{Ca}^{2+}$  en la hidroxiapatita y formando parte de un depósito dinámico capaz de liberarse ante determinadas situaciones como desnutrición, embarazo, lactancia y postmenopausia. Así, actualmente se sabe que el Pb está presente en el organismo en por lo menos cuatro compartimentos: 1) de intercambio rápido como en sangre; 2) de recambio medio como en piel, órganos internos blandos y músculos; 3) de recambio lento representado por la fracción intercambiable de Pb de huesos planos y diáfisis de huesos largos y 4) de recambio muy lento como los extremos de huesos largos (Casarett y cols, 2008). Aunque no se conoce exactamente su vida media en el organismo, se acepta que sería entre 15 y 27 años en adultos (Liu y cols, 2008). Finalmente, se elimina principalmente a través de orina (75%), heces y bilis (16%), cabello, lágrimas, saliva y sudor (8%), así como también a través de la leche materna. Puede atravesar la placenta por difusión simple dependiente de la proporción del flujo sanguíneo fetal; más aún se ha observado una relación entre la

concentración del metal en la sangre materna y el cordón umbilical (Casarett y cols, 2008).

Como se detallará más adelante estos aspectos toxicocinéticos han sido considerados tanto en el diseño del esquema experimental como en las conclusiones de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

### *Plomo como neurotóxico del desarrollo*

Numerosas evidencias han señalado que no se requieren cantidades elevadas de Pb en sangre para inducir efectos neurotóxicos, por el contrario la presencia de este metal aún en cantidades trazas es suficiente para generar una huella ("*imprinting*") que puede manifestarse a lo largo de la vida del individuo. Ciertos eventos como estrés, adicción a drogas, envejecimiento, entre otros que suponen un desafío para el organismo pueden incluso potenciar aún más su neurotoxicidad.

Existe particular vulnerabilidad tanto en humanos como en animales de experimentación si esta exposición ocurre durante el período fetal y posnatal temprano (Gulson y cols, 1997d). Al respecto hay estudios que reportan que la exposición temprana induce daño cognitivo, alteraciones conductuales y una respuesta alterada a drogas de abuso tanto en seres humanos como en animales de experimentación (Patrick y cols, 2006). Estudios realizados tanto en primates no humanos como en roedores han señalado, que estas alteraciones conductuales son similares a las observadas en seres humanos y que se presentan a plumbemias comparables en todas las especies (Bellinger y cols, 2006). Se han reportado deterioros en el aprendizaje tanto en niños como en animales de experimentación con niveles de Pb muy bajos en sangre. Estas manifestaciones neuroconductuales se evidencian predominantemente cuando la exposición transcurre durante el desarrollo, período de singular susceptibilidad para los seres vivos a la exposición a Pb debido a aspectos toxicocinéticos propios del metal como una mayor absorción acompañado de una menor excreción, así como ontogénicos (inmadurez de la barrera hematoencefálica) o hábitos propios de la edad (pica, llevarse las manos y objetos a la boca, etc.) (Canfield y cols, 2003). Además, el Pb es capaz de atravesar la barrera placentaria, por lo que si la madre se encuentra durante este período expuesta al metal o ha sufrido exposición en alguna etapa de su vida, la remoción del Pb desde el depósito óseo aún en cantidades mínimas, puede generar en el organismo en desarrollo una traza que puede permanecer a lo largo de su vida (Patrick y cols, 2006). Precisamente estas alteraciones han alertado a organismos internacionales como la OMS

(Organización Mundial de la Salud) y los CDC, a establecer políticas preventivas principalmente para los niños, de sectores de bajos recursos y para embarazadas que son la población más vulnerable.

A pesar de que los efectos tóxicos del Pb sobre el SNC son los más importantes para la salud humana, una de las manifestaciones de toxicidad más característica y de mayor utilidad para el diagnóstico, es la anemia que se produce al estar impedida la formación de la hemoglobina, por la inhibición de tres enzimas claves en su formación:  $\delta$ -amino-levulínico sintetasa,  $\delta$ -amino-levulínico dehidrasa y hemosintetasa. La consecuencia es la disminución en la formación de hemoglobina y el aumento de la presencia de tres precursores:  $\delta$ -amino-levulínico, porfobilinógeno y protoporfirina IX, que pueden ser identificados y servir de indicadores bioquímicos de la intoxicación por Pb (Ahamed y cols, 2012).

Si bien los efectos del Pb sobre numerosos sistemas, principalmente sobre el SNC están bien descritos, no ha sido definido hasta el momento su mecanismo de acción tóxica, debido principalmente a que su patogénesis no obedecería a un mecanismo único, sino que por el contrario, su etiología sería multifactorial. Uno de los mecanismos propuestos para el accionar del Pb en el SNC es su habilidad de sustituir al  $\text{Ca}^{2+}$  en todos los procesos celulares en los que interviene este metal. Se ha descrito además, que el Pb también actúa modificando la activación enzimática, inhibiendo la absorción de minerales traza, uniéndose a grupos tioles de proteínas, alterando la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , induciendo estrés oxidativo y disminuyendo las reservas antioxidantes del organismo.

### *Plomo, estrés y drogas de abuso*

Durante los últimos años, se han reportado evidencias que relacionan la exposición a Pb con la vulnerabilidad al abuso de ciertas drogas. Resultados publicados por nuestro laboratorio así como por otros autores han demostrado que tanto la exposición temprana como adulta a Pb induce alteraciones conductuales asociadas a determinadas drogas de abuso, por lo que se ha sugerido que la exposición al Pb podría incrementar la vulnerabilidad del SNC a la adicción a drogas (Yu y cols, 1996; Ensminger y col, 1997; Virgolini y cols, 1999; Cory-Slechta y cols, 2004; Virgolini y cols, 2004; Haider y cols, 2013; Virgolini y Cancela, 2014). De esta forma ha surgido un

interés particular dentro del campo de la toxicología orientado al estudio de la interacción de varios agentes químicos, incluyendo a las drogas de abuso.

Los estudios basados en determinar la capacidad de la exposición al Pb sobre la respuesta a la administración a drogas, como la anfetamina han arrojado resultados contradictorios (Rafaeles y cols, 1981; Rafaeles y cols, 1987; Silbergeld y cols, 1971; Wince y cols, 1980) que pueden atribuirse a diferencias en los protocolos de exposición al Pb y a diferencias en cuanto a su metodología de administración. Al respecto resultados de nuestro laboratorio, demostraron que la exposición a este metal cuando se efectúa durante el desarrollo indujo un incremento de la respuesta locomotora a anfetamina, la cual estuvo influenciada por la hiperlocomoción provocada por el estrés de la inyección, manifestaciones que cursaron con un incremento paralelo de los niveles de corticosterona (principal hormona liberada en respuesta al estrés) (Virgolini y cols, 2004). En relación a los niveles de corticosterona, se encuentran antecedentes que señalan que tanto la exposición temprana como durante la vida adulta a Pb produce tanto un incremento basal así como un incremento de la secreción de esta hormona ante un evento estresante como por ejemplo una inyección de solución salina, lo cual favorece que la exposición a Pb produzca una mayor reactividad a situaciones estresantes (Cory-Slechta y cols, 2004; Virgolini y cols, 1999; Virgolini y cols, 2004; Yu y cols, 1996; Haider y cols, 2013).

En relación a la respuesta a otras drogas como la cocaína, se han observado también respuestas contradictorias, en relación a los efectos estimulantes y reforzantes de la misma. Se ha evidenciado un retraso en la sensibilización conductual y la autoadministración de la droga (Nation y cols, 1996), una respuesta locomotora atenuada (Gover y cols, 1993) pero al mismo tiempo una incrementada sensibilización ante la administración repetida de la misma (Nation y cols, 2000), una mayor reinstalación de cocaína (Nation y cols, 2003) y un incremento de su autoadministración (Rocha y cols, 2005). Paradójicamente la administración aguda de cocaína a ratas expuestas a Pb durante el desarrollo provoca una atenuación de las propiedades reforzantes de la droga en un paradigma de condicionamiento de lugar asociado a la droga (Miller y col, 2000). Adicionalmente resultados de nuestro laboratorio (no publicados), en los que se evaluó mediante una curva dosis-respuesta de cocaína en animales peradolescentes, se pudo observar que la dosis de 5 mg/kg incremento significativamente la actividad locomotora selectivamente en el grupo expuesto a dosis bajas de Pb en relación a sus respectivos controles, mientras que a la dosis de 10 mg/kg

esta hiperlocomoción se manifestó tanto en los animales controles como en los expuestos a Pb y a 2,5 mg/kg esta respuesta no fue evidente en ninguno de los dos grupos. Además y de manera interesante en un modelo de sensibilización cruzada entre estrés y cocaína, que ha sido desarrollado por nuestro laboratorio (Esparza y cols, 2012), demuestra que 24 h después de la última sesión de estrés crónico por inmovilización (un total de 7 sesiones de 2 h de duración cada una) se observa hiperactividad basal en los primeros 10 min de la prueba de locomoción en todos los grupos, incluso en los animales expuestos al Pb no estresados (excepto en los animales controles no estrés), efecto que desapareció durante la habituación y en la fase de respuesta al vehículo, pero que se manifestó nuevamente ante la administración de 5 mg/kg de cocaína. Cabe destacar que estas respuestas no fueron permanentes puesto que no se observaron 21 días después de la última sesión de estrés crónico por inmovilización. Por lo que podemos concluir en relación a los efectos estimulantes y reforzantes asociados a cocaína, nuevamente al igual que con anfetamina que las respuestas dependerían en gran medida tanto del período del desarrollo en el que ocurrió la exposición como de las condiciones experimentales en las que fueron evaluadas.

En relación al impacto de la exposición de Pb sobre el sistema opioide, nuevamente el período al cual ocurre esta exposición fue determinante de los efectos que se manifestaron. Cuando la exposición se produjo durante la edad adulta, se observó una reducción en la actividad locomotora inducida por morfina en los animales adultos, en tanto que la exposición temprana produjo un incremento de la misma (Miller y cols, 2000b). Con respecto a las propiedades reforzantes, tanto el condicionamiento a un sitio previamente asociado a morfina (Valles y cols, 2003), como la autoadministración de esta droga (Cardon y cols, 2004) se vieron reducidas por la exposición a Pb durante el desarrollo.

En resumen, numerosos datos parecen apuntar hacia la existencia de una importante interacción con bases neurobiológica entre el Pb y las drogas de abuso (Virgolini y Cancela 2014), lo cual es aplicable a otros metales pesados y pesticidas, sin embargo no se han reportado todavía datos certeros que permitan dilucidar cuál es el mecanismo que subyace en esta interacción.

*Plomo y etanol: ¿existe un sitio de acción en común?*

A semejanza de otras drogas de abuso, existen evidencias que avalan la existencia de una interacción entre el Pb y el ETOH a nivel bioquímico, farmacológico y conductual. Al respecto existen datos que revelan que el consumo elevado de ETOH es capaz de elevar los niveles de Pb en sangre en una relación aproximada de 0,5-1.0  $\mu\text{g}/\text{dl}$  por cada 1,35 cl. de ETOH consumido diariamente (Pizent y cols, 2001). Por otra parte, el ETOH interacciona con el Pb, interfiriendo en la biosíntesis del grupo hem, potenciando la inhibición enzimática (ej de  $\delta$ -ALA, enzima intramitocondrial implicada en la síntesis del hem) y prolongando la fase de intoxicación hepática y eritropoyética (Lopez y cols, 2002).

Desde el punto de vista neuroconductual, numerosas evidencias apoyan también esta interacción. En una serie de experimentos realizados en animales adultos que fueron expuestos a Pb durante la edad adulta, se observó que algunas respuestas a los efectos farmacológicos del ETOH estarían atenuadas tales como la analgesia (Burkey y cols, 1994), la narcosis y el palanqueo por ETOH en un paradigma de autoadministración oral de la droga (Nation y cols, 1991 a y b). Sin embargo, otras evidencias mostraron un incrementado consumo oral de ETOH (Nation y cols, 1986) y un incremento de la actividad locomotora inducida por ETOH (Correa y cols, 1999). Como puede evidenciarse, los resultados obtenidos en los estudios experimentales son muy variados, dependen por una parte en la forma de administración de ambas sustancias (crónica o aguda), de las dosis utilizadas para cada una de las drogas, del tipo de test conductual y principalmente del periodo evolutivo en el que se encuentran los sujetos experimentales (perinatales o adultos).

Una posible explicación a esta interacción se basa en la hipótesis de tensión-reducción, la cual propone que el efecto ansiolítico de ETOH sería el principal factor que lleva a algunos individuos a consumir ETOH para enfrentar situaciones que generan estrés y ansiedad (Pohorecky y cols, 1981). En relación a esto y como se mencionó anteriormente, los animales expuestos al Pb durante el desarrollo presentaron una mayor reactividad al estrés (inyección de salina) y a los efectos ansiolíticos de ETOH. Se observó además un incremento del consumo voluntario de ETOH (efecto presente sólo en las crías periadolescente y no en adultos) asociado a elevados niveles basales de corticosterona (Virgolini y cols, 1999, 2004). En relación a los niveles de corticosterona, se ha reportado que tanto la exposición temprana como durante la vida



adulta a Pb produce elevados niveles basales de la hormona, así como un incremento de la secreción de la misma ante un evento estresante como por ejemplo ante una inyección de solución salina, lo cual condicionaría que la exposición a Pb produciría una mayor reactividad a situaciones estresantes (Cory-Slechta y cols, 2004; Virgolini, 1999; Virgolini y cols, 2004; Yu y cols, 1996; Haider y cols, 2013). Algunos autores han sugerido que serían estos elevados niveles de corticosterona los cuales estarían condicionando el incremento del consumo de ETOH (Prasad y Prasad, 1995), ya que se ha demostrado que la remoción de las adrenales (Fahlke y cols, 1994b) o la administración de un inhibidor de la síntesis de corticosteroides (Fahlke y cols, 1994) fue capaz de inhibir este incremento, el cual fue revertido con la administración de corticosterona (Fahlke y Eriksson, 2000).

Otra posibilidad de interacción y sobre la cual esta tesis realiza algunas intervenciones se centra en el estrés oxidativo. Se ha descrito que el Pb, al igual que otros metales pesados, induce peroxidación de los lípidos en las membranas celulares y que, es capaz de modificar la actividad de los sistemas de enzimas antioxidantes de la célula entre ellos catalasa (CAT) y la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Somashekaraiah y cols, 1992; Sugawara y cols, 1991). En esta hipótesis es necesario considerar la particularidad de la enzima CAT al presentar un rol dual, puesto que por una parte forma parte de la batería de enzimas antioxidantes con que cuenta el organismo y por otra tiene una participación a nivel del metabolismo central del ETOH.

Por lo todo lo expuesto es muy probable, que la interacción entre Pb y ETOH sea el resultado de efectos multifactoriales más que de un mecanismo único, los que estén influenciando de alguna manera la manifestación de respuestas a nivel bioquímico, neuroendócrino y conductual.

### *Catalasa como enzima antioxidante*

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son compuestos que derivan de la molécula de oxígeno ( $O_2$ ) por reducción química parcial, e incluyen a las formas reactivas del oxígeno, que abarcan a los superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) y al radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Muchos procesos que ocurren naturalmente en la célula generan estas especies, por ejemplo la cadena respiratoria mitocondrial, las enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas y la acil CoA oxidasa, las citocromo P450 y

pequeñas moléculas autooxidables como las catecolaminas y las quinonas (Helaine y cols, 2006; Chihuailaf y cols, 2002).

Papas (Papas y cols, 1999) define a los antioxidantes como cualquier sustancia que retrasa o previene significativamente la oxidación de diversos sustratos biológicos, es decir minimizando el daño oxidativo. Los antioxidantes pueden ser compuestos endógenos producidos por el organismo o compuestos exógenos adquiridos de la dieta (Helaine y Hagerman, 2006).

Bajo ciertas condiciones fisiológicas en el organismo existe un balance entre la cantidad de EROs que se producen y los antioxidantes que intentan contrarrestarlos como puede observarse en la figura 4. Sin embargo cuando este balance es perturbado por algún motivo y la cantidad de EROs comienza a ser excesiva se produce lo que se define como estrés oxidativo. El estrés oxidativo, involucra un desbalance entre la generación de EROs (y su acumulación celular con el daño que esto conlleva) y la presencia de sistemas antioxidantes.

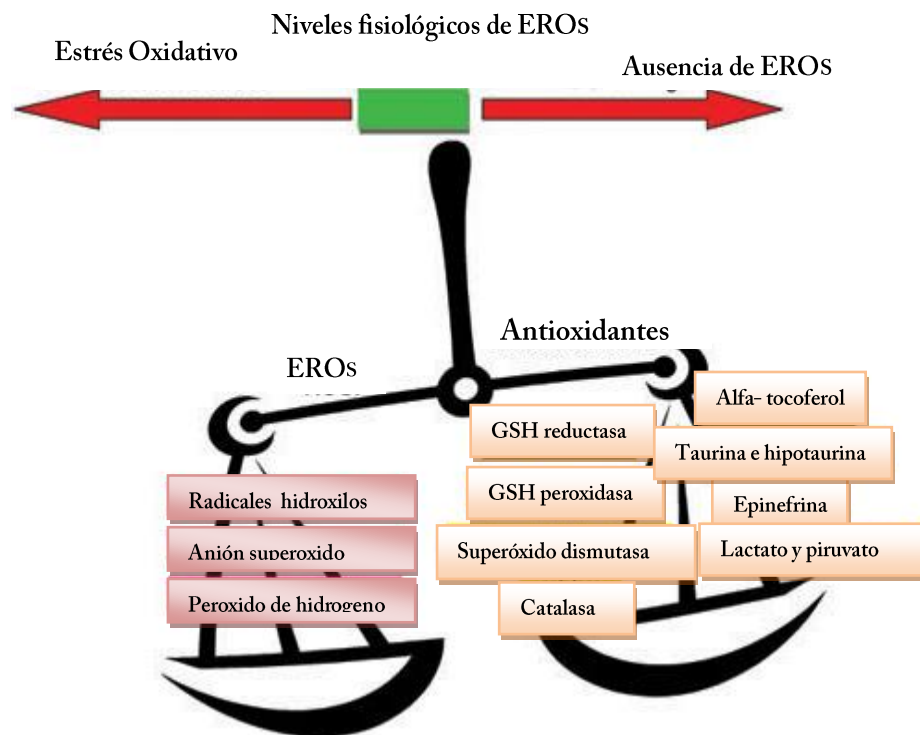


Figura 4: Balance entre la formación de EROS y presencia de antioxidantes.

El proceso enzimático de remoción de EROs involucra una serie de reacciones como puede observarse en la figura 5, iniciadas por la enzima superóxido dismutasa (SOD), encargada de convertir el  $O_2^{\cdot-}$  producido por la cadena de transporte

mitocondrial a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este compuesto es también altamente tóxico para las células, por lo que es removido por las enzimas CAT y glutatión peroxidasa (GPx). La reacción química en la cual intervienen estas enzimas es la siguiente:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}=\text{Fe}(\text{IV})^{\text{e}} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}(\text{III})^{\text{e}} + \text{O}_2$ , donde  $\text{Fe}^{\text{e}}$  representa el núcleo de Fe del grupo hem unido a la enzima que actúan como cofactores.

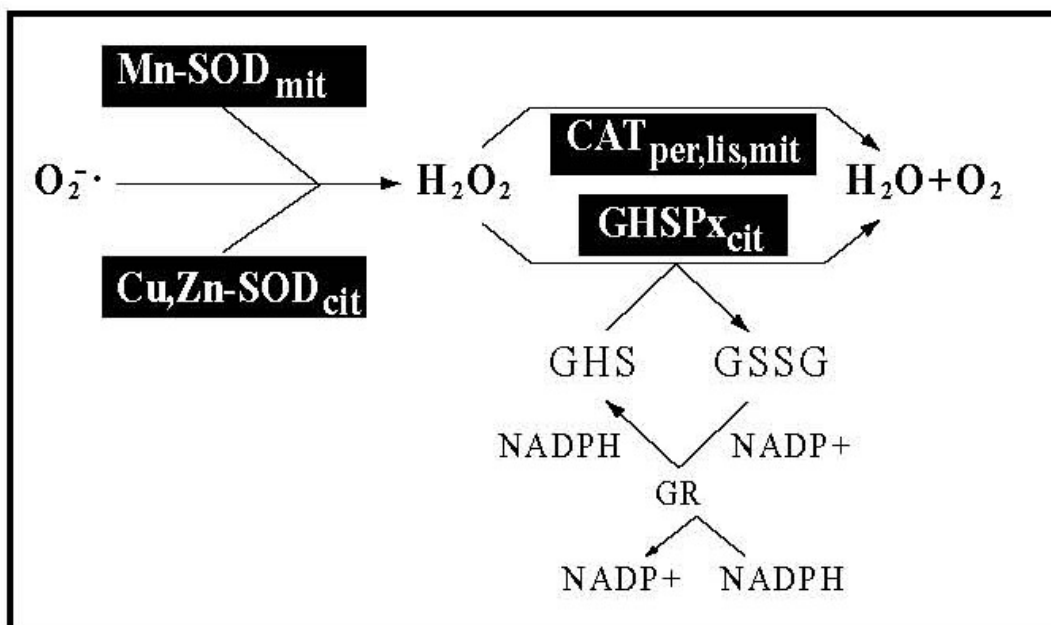


Figura 5: Sistema de defensa antioxidante del organismo y remoción enzimática de EROs (extraído de Soto-Bernadini y cols, 2008). La enzima SOD (superóxido dismutasa), es la enzima encargada de convertir el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (superóxido) en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogeno). Existen dos tipos de SOD: cobre zinc-superoxido dismutasas (Cu, Zn-SOD) localizadas en el citosol y las manganeso superoxido dismutasas (Mn-SOD) a nivel mitocondrial. Este  $\text{H}_2\text{O}_2$  es removido tanto por CAT (catalasa) que se ubica principalmente a nivel de peroxisomas y GPx (glutatión peroxidasa), la cual utilizando GH (glutatión reducido) lo convierte en GSSG (glutatión oxidado). Finalmente éste es reducido nuevamente por la G (glutatión reductasa).

Si bien el Pb es un metal inactivo desde el punto de vista redox, es capaz de alterar el balance pro oxidante/antioxidante de los tejidos, lo cual conformaría uno de los mecanismos propuestos que explicarían su capacidad para inducir estrés oxidativo. Así, el daño oxidativo inducido por este metal se produciría por dos vías diferentes 1) mediante la generación de EROs incluyendo a los  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{HO}^{\cdot}$  y 2) por la

depleción directa de las reservas antioxidantes, manifestada como cambios en la actividad de varias enzimas: CAT, SOD, GPx y glutatión reductasa (G) principalmente (Ahamed y cols, 2007). Con respecto a su capacidad para generar EROs, se ha especulado que puede originarse por un efecto directo del Pb sobre las membranas celulares, ocasionando peroxidación lipídica o, por inhibición de ácido delta aminolevulínico deshidratasa ( $\delta$ -ALA) que es una enzima que contiene grupos sulfhídricos, lo que llevaría a una acumulación de  $\delta$ -ALA, una fuente endógena de EROs (Hermes y cols, 1991). En cuanto a los efectos inducidos sobre las enzimas antioxidantes, se ha sugerido que mientras bajos niveles de Pb producen un incremento de la actividad de estas enzimas, la supresión de las mismas ocurre a niveles más altos y durante períodos más prolongados de exposición. Puesto que tanto CAT como GPx están implicadas en el desdoblamiento del  $H_2O_2$ , se ha sugerido que CAT actuaría principalmente como un mecanismo de defensa ante un excesivo nivel de  $H_2O_2$ , mientras que la GPx actuaría predominantemente en presencia de bajos niveles del mismo (Bechara y cols, 1996). Así, se ha reportado un incremento en la actividad de CAT en hígado (Drigen y cols, 2005), riñón (Aykin-Burns y cols, 2003) y cerebro (Gurger y cols, 2000) de organismos expuestos al Pb; alteraciones que también se han reportado en sangre de trabajadores expuestos al mismo (Correa y cols, 2000). Se postula que el aumento en la actividad de estas enzimas se produciría como un mecanismo compensatorio de detoxificación inducido por la administración aguda o crónica de Pb. Al respecto, se ha observado que la exposición temprana a altas dosis de Pb provoca un incremento de la actividad de CAT en cerebro y cerebelo así como de la enzima GPx en hipotálamo e hipocampo en animales jóvenes (Valenzuela y cols, 1989).

Además, como se mencionó anteriormente existen evidencias que indican que la peroxidación lipídica se ve incrementada luego de la administración de Pb. Se trata de un proceso "*in vivo*" en el cual, alguna forma activa de oxígeno reacciona con ácidos grasos polinsaturados para formar peróxidos semiestables, preferentemente a través del mecanismo de radicales libres, con el consecuente cambio en la actividad GPx, así como de CAT. De hecho, se ha observado un incremento significativo en la actividad de CAT en cerebro y en cerebelo entre los días 12 y 16 después de la exposición a Pb. Este incremento se debería a un aumento en la formación de hidroperóxidos lipídicos en el cerebro, lo cual constituiría una señal para mantener niveles altos de actividad tanto de GPx como de CAT (Patrick y cols, 2006). En base a estas consideraciones, se puede afirmar que la exposición a Pb puede actuar como un inductor de la actividad enzimática

de CAT, lo cual no sólo adquiere relevancia en el mantenimiento del equilibrio redox en el organismo luego de la exposición a este metal, sino que tiene asimismo importantes implicancias en el metabolismo de ETOH y en el estudio de sus propiedades adictivas como se detallará más adelante, la cual es objeto de esta tesis.

Por otra parte es conocido que el ETOH también produce estrés oxidativo. Al respecto, la principal consecuencia de la naturaleza oxidante de su metabolismo es la continua producción de radicales libres derivados del  $O_2$ , incluyendo al  $O_2^{\cdot-}$ , al  $H_2O_2$ , y a los iones  $OCI^{\cdot}$  y  $HO^{\cdot}$ , radicales que son naturalmente generados por reacciones celulares (Zakhari y cols, 2007).

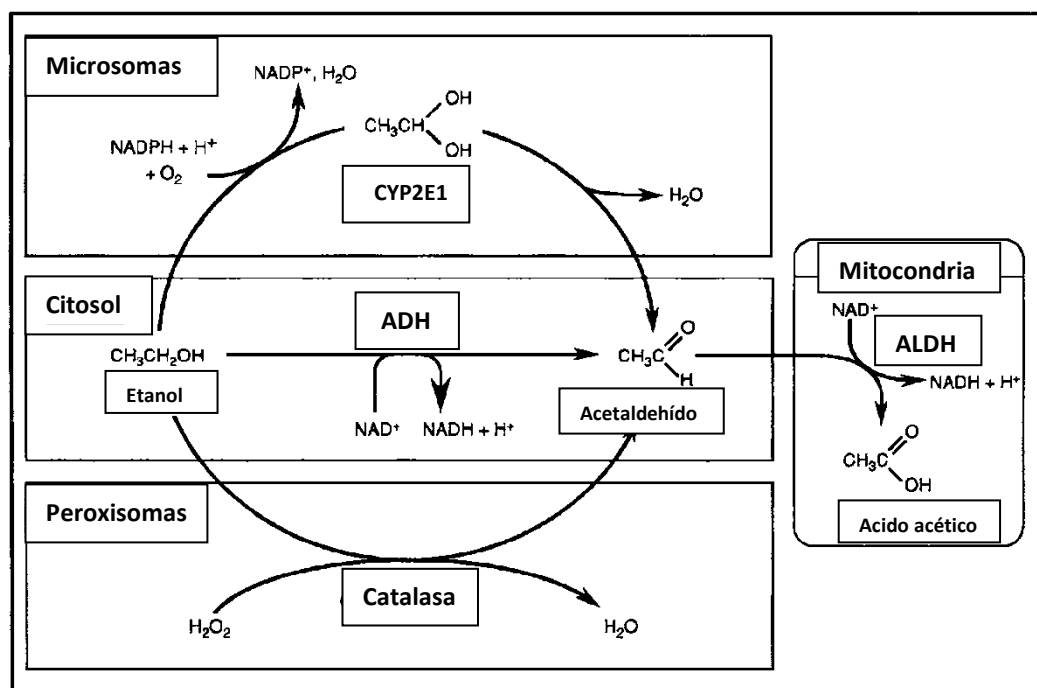
En resumen, el conjunto de estas evidencias apoyarían la hipótesis de que el Pb y el ETOH son capaces de inducir estrés oxidativo no sólo por generación de EROs, sino por modificaciones en la activación enzimática, entre las que se encuentra la CAT (en el caso particular del Pb), la cual como se mencionó presenta una función dual puesto que no sólo cumple funciones en el organismo como antioxidante sino que también participa en el metabolismo de ETOH como se describirá a continuación.

### *Metabolismo periférico del ETOH*

El ETOH ingresa al organismo principalmente por vía oral, pasando por el tubo digestivo hasta llegar al estómago donde se absorbe aproximadamente el 20% del ETOH ingerido, completándose finalmente su absorción en el intestino delgado (Zakhari y cols, 2007). En el hígado va a ser rápidamente metabolizado a ACD por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y oxidado posteriormente a acetato por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), ambas reacciones dependientes de la disponibilidad de NADH. Por lo tanto, el paso limitante de la reacción es la reoxidación de NADH a  $NAD^+$  en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Cantidades más elevadas de ETOH son metabolizados por la isoenzima microsomal CYP2E1 perteneciente al sistema citocromo P450. Por lo tanto, la principal vía metabólica de oxidación del ETOH en el hígado involucra la enzima ADH presente en el citosol. Esta vía va a producir ACD (acetaldehído), un compuesto altamente reactivo y tóxico a nivel periférico, el cual puede contribuir a la producción de daño tisular como así también estar involucrado en el proceso adictivo inducido por ETOH como se explicará a continuación. De esta manera cuando el ETOH pierde su hidrógeno y genera equivalentes reducidos (NADH) siendo oxidado a ACD, cada uno de estos productos es directamente responsable de una variedad de alteraciones que incluyen disfunciones del

metabolismo proteico y lipídico. Por otra parte, la enzima citocromo CYP2E1 que está presente predominantemente en los microsomas, vesículas o en membranas de células sin retículo endoplasmático, también contribuye al metabolismo hepático del ETOH. Esta enzima es inducida en el caso de un consumo crónico de ETOH y además asume un rol muy importante en la metabolización a ACD en presencia de altas concentraciones de ETOH (Montoliu y cols, 1994).

Si bien es considerada como un componente de una vía metabólica menor a nivel periférico, se ha demostrado que el consumo crónico de ETOH en ratas, incrementa la producción de  $H_2O_2$  en regiones pericentrales del hígado conllevando a un incremento de la actividad de CAT en ese órgano (Misra y cols, 1992). Además es capaz de difundir al SNC y allí va a ser metabolizado a ACD, proceso mediado casi exclusivamente por la enzima peroxisomal CAT en presencia de  $H_2O_2$  (Zakhari y cols, 2007; Zimatkin y Deitrich, 2007). En la figura 6 se encuentra esquematizada las vías metabólicas implicadas en la oxidación del ETOH en el organismo.



**Figura 6:** Representación esquemática del metabolismo oxidativo del ETOH extraído y modificado de Lui y cols 2014. Bajo condiciones fisiológicas normales, el ETOH es metabolizado principalmente en el hígado. Es oxidado a ACD (acetaldehído), por la enzima ADH (alcohol deshidrogenasa) la cual presenta localización citosólica; posteriormente el ACD es oxidado a acido acético por la enzima ALDH (aldehído deshidrogenasa) la cual se localiza principalmente a nivel mitocondrial. Este proceso oxidativo depende de

la disponibilidad de  $\text{NAD}^+$ . Existen otras vías que presentan una contribución menor como son CYP2E1 y CAT (catalasa). A nivel cerebral, el ETOH por el contrario es metabolizado principalmente por CAT y en menor medida por CYP2E1 puesto que se ha demostrado que ADH presenta una actividad prácticamente nula en el SNC.

### *Catalasa en el metabolismo de ETOH*

CAT, es una enzima que se localiza en el interior celular en los peroxisomas (Gaunt y cols, 1976). Como se mencionó con anterioridad, esta enzima junto con la SOD, funciona como un regulador de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el organismo. Sin embargo, Keilin y Hartree (Keilin y Hartree, 1945) demostraron que CAT no sólo participa en la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sino que además media la metabolización del ETOH a ACD en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De esta manera se demostró que, dependiendo de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CAT es capaz de ejercer una función dual. A bajas concentraciones actúa de manera peroxídica, de modo que una variedad de dadores de hidrógeno, entre los que se encuentra el ETOH, metanol, entre otros pueden ser oxidados, mientras que a altas concentraciones de sustrato, la CAT ejerce una función catalítica descomponiendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Berkaloff y cols, 1988).

Se ha logrado demostrar que CAT, utiliza tanto en la reacción peroxídica como en la catalítica un mecanismo de dos pasos. En una primera etapa, el Fe del grupo hemo de la enzima reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar un  $\text{H}_2\text{O}_2$  rico en Fe, que se conoce como compuesto I, el cual a bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es el que reacciona con el ETOH para formar ACD por la vía peroxídica, mientras que a altas concentraciones reacciona con una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para producir  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  por medio de la vía catalítica, siendo el rango limitante en ambas reacciones la disponibilidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Al respecto, se ha observado que en órganos como el hígado y los riñones en donde hay elevadas concentraciones de CAT se encuentran bajos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; más aún si la actividad de CAT se inhibe, las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentan también (Yang y cols, 1998); por el contrario en órganos como el corazón, que tienen una baja concentración de CAT se encuentran altos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chen y cols, 1996). Esta enzima no parece tener gran implicancia a nivel hepático bajo condiciones fisiológicas ya que el pretratamiento con inhibidores de CAT no produce alteraciones significativas en la farmacocinética del ETOH (Tampier y cols, 1987). Es decir que a nivel del metabolismo periférico, la oxidación del ETOH por parte de CAT, corresponde a una vía metabólica de menor importancia. Al respecto, se sabe que sólo a

dosis de ETOH mayores a 3 g/kg tendría impacto en el metabolismo del ETOH (Tampier y Mardones, 1986; Aragón y cols, 1991b). Sin embargo, a nivel del metabolismo central y debido a que se observa una distribución y una actividad prácticamente nula y limitada de la enzima ADH (Kerr y cols, 1989; Martínez y cols, 2001), la vía metabólica mediada por CAT, adquiere un rol preponderante como la principal vía oxidativa del ETOH a nivel del SNC siendo responsable de aproximadamente el 60% del metabolismo cerebral de ETOH, mientras que un 20% estaría a cargo de la CYP450 (Gill y cols, 1996; Zimatkin y cols, 2006).

La reacción entre el compuesto I y el ETOH a nivel cerebral se encuentra sustentada por numerosas evidencias. Experimentos realizados con inhibidores de CAT, dependientes de  $H_2O_2$  tales como AT (aminotriazol), 4-hidroxipirazol o azida sódica, ponen en evidencia que la administración previa de ETOH, tanto *in vitro* como *in vivo*, previene a CAT de la acción inhibitoria de estos compuestos (Aragón y cols, 1986; 1991 a, b, c), lo cual sugiere la existencia de una competencia entre el ETOH y los inhibidores por el compuesto I. Por otra parte, ha sido demostrada la presencia así como la generación de  $H_2O_2$  a nivel cerebral tanto *in vitro* como *in vivo* (Aragón y cols, 1991c), postulándose incluso a esta especie como un neuromodulador (Rice, 2011). Puede concluirse entonces que CAT y  $H_2O_2$  reaccionan para formar el compuesto I, el cual es destruido de manera irreversible cuando reacciona con inhibidores como AT o azida sódica.

Los primeros estudios que aportaron evidencias de la oxidación de ETOH a ACD por medio de CAT cerebral fueron presentados por Cohen (Cohen y cols, 1980) y Mardones (Mardones y cols, 1979). Cohen demostró que el ETOH podía prevenir la inhibición de CAT cerebral por AT *in vivo*, mientras que Mardones *in vitro*, reportó que la adición de AT a homogenatos cerebrales de rata, producía la reducción del 50% de la oxidación de ETOH respecto de los controles.

Posteriormente, otros estudios logaron confirmar estos resultados respecto al papel central de CAT en la mediación de la oxidación de ETOH. En relación a esto, la utilización tanto de metirapone – un inhibidor de CYP450- como de pirazol –un inhibidor de ADH, no fueron capaces de influenciar la formación de ACD en homogenatos de cerebros de ratas a partir de ETOH, mientras que la incubación en el medio con AT, cianamida (CIAN) o azida sódica, todos inhibidores de CAT, disminuyeron considerablemente la formación de ACD (Aragón y cols, 1991c; Gill y cols, 1992). Además la adición al medio de  $H_2O_2$  o de glucosa oxidasa, un sistema



generador del mismo, fue capaz de incrementar la formación de ACD (Aragón y cols, 1992a).

También se obtuvieron evidencias de pruebas realizadas con cepas de ratones genéticamente diferentes en los niveles de CAT: ratones silvestres (CH3N) y acatalasémicos (C3HA) (Aragón y cols, 1993), quienes presentan niveles inferiores de CAT, aproximadamente 50% más bajos que los normales. Cuando los homogenatos de estos cerebros fueron incubados con ETOH, se evidenciaron diferencias significativas en la cantidad de ACD generado en ambos grupos, siendo los ratones acatalasémicos los que produjeron menor cantidad de ACD (Aragón y cols, 1993). Otros datos presentados por Zimatkin (Zimatkin y cols, 1998), sugieren la acumulación de ACD cerebral en diferentes estructuras cerebrales, el cual fue eliminado parcialmente tras ser incubado con ETOH y la administración previa de AT. Además se ha observado que en cultivos de neuronas hipotalámicas, el AT fue capaz de disminuir de manera dosis dependiente la formación de ACD (Reddy y cols, 1995). Otros autores han demostrado, que cerebros de ratas pretratadas crónicamente con 0,5 y 1 g/Kg de AT, la actividad de CAT cerebral disminuyó entre 100 y 10.000 veces. Sin embargo, las concentraciones de ETOH en sangre no fueron modificadas, aunque la concentración de ETOH a nivel cerebral aumentó tras el tratamiento de la mayor dosis de AT (1 g/Kg) (Lallemand y cols, 1999).

En resumen, los resultados obtenidos, tanto *in vivo* como *in vitro* apoyan la idea del papel crucial de CAT en el metabolismo a nivel cerebral del ETOH, que adquiere particular importancia como se detallará a continuación en relación a los efectos farmacológicos de éste último.

### *Catalasa y la hipótesis del ACD en las conductas inducidas por ETOH*

El primer producto del metabolismo del ETOH, el ACD ha sido involucrado en diversas conductas asociadas a la droga. Al respecto existen opiniones contradictorias, algunos investigadores sostienen que este compuesto no desempeñaría ningún rol definido en los efectos del ETOH, mientras que otros opinan que las acciones farmacológicas del ETOH estarían en realidad mediadas por el ACD. Sin embargo, otros autores plantean que los niveles de ACD que se alcanzan en cerebro, son extremadamente bajos como para producir efectos farmacológicos. Una posición intermedia mantiene la posibilidad que ambos estarían actuando de manera sinérgica

provocando consecuencias tanto a nivel conductual como neuroquímico (Quertemont y cols, 2004). La figura 7 ilustra las distintas posturas relacionadas al accionar del ACD.

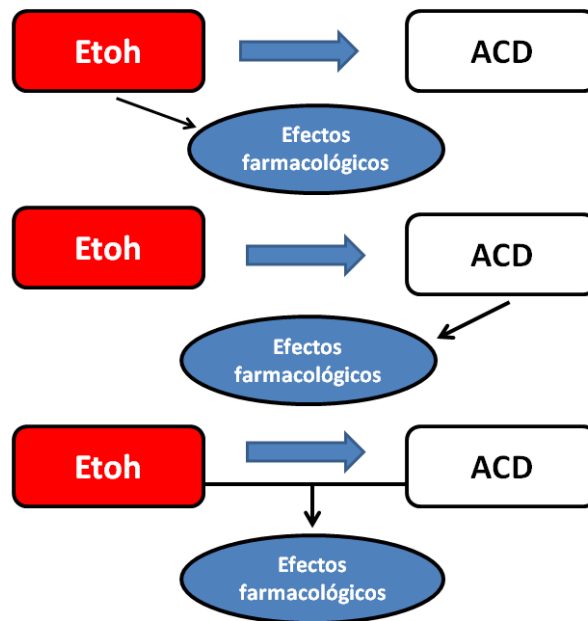


Figura 7: Representación esquemática de los tres modelos alternativos que dan cuenta del papel de acetaldehído (ACD) en los efectos del etanol (ETOH) extraído y modificado de Quertemont y cols, 2006.

Teniendo en cuenta la importancia adjudicada al ACD en las propiedades farmacológicas del ETOH y la relevancia de CAT mediando la oxidación del ETOH a nivel central, se plantea la posibilidad de que la actividad de CAT sería un predictor de algunas conductas asociadas al ETOH, como el consumo voluntario del mismo, entre otras, el cual mediante la acción de CAT a nivel cerebral llevaría a alcanzar niveles cerebrales significativos de ACD. Sin embargo, una de las mayores dificultades que se encuentran actualmente para brindar soporte a esta aserción se relaciona con la detección de niveles relevantes de ACD en el cerebro (Aragón y Amit, 1992; Sanchis-Segura y cols, 1999; Escarabajal y cols, 2000; Quertemont y cols, 2005; Correa y cols, 2008; Correa y cols, 2012). Aún cuando unos pocos autores, a través de manipulaciones farmacológicas y la utilización de determinada metodología han sido capaces de medirlo (Jamal y cols, 2003; Jamal y cols, 2008), los niveles de ACD que se requieren para producir efectos farmacológicos continúan sin ser determinados.

Numerosas evidencias han demostrado farmacológicamente, que al modificar el metabolismo del ETOH varios de sus efectos conductuales son mediados por la presencia en el cerebro de ACD (Quertemont y cols, 2005). Esta posibilidad se presenta en contraposición a las evidencias que demuestran que la acumulación de ACD a nivel periférico se encuentra asociada a los efectos aversivos de la droga (alteraciones cardíacas, náuseas, dolores de cabeza), los cuales son inducidos en la terapia farmacológica de alcohólicos mediante drogas que tratan de impedir el metabolismo hepático a través de la inhibición de la ALDH (Chao y cols, 1995). Al respecto, es importante considerar que el ACD formado en la periferia difícilmente puede alcanzar el SNC, ya que a nivel de la barrera hematoencefálica es degradado por la presencia de una barrera metabólica de ALDH. Por lo tanto, puede concluirse que el ACD que se encuentra a nivel central es producido localmente, salvo en el caso de que niveles extremadamente elevados provenientes del metabolismo periférico pueden llegar a saturar la barrera e ingresar al SNC (Zimatkin y cols, 1996).

Se ha demostrado que la administración intracerebral de ACD, en bajas dosis es capaz de inducir efectos conductuales psicoestimulantes y reforzantes que son similares a los producidos por el ETOH y que son característicos de drogas con capacidad adictiva (Font y cols, 2006; Font y cols, 2008; Rodd-Henricks y cols, 2005). Usando paradigmas de conducta operante, se ha demostrado que ratas genéticamente seleccionadas para preferir ETOH, presionan una palanca para autoadministrarse ETOH y ACD en ATV (área tegmento ventral), y sorprendentemente el ACD llega a ser un reforzador 1.000 veces más potente que el ETOH. Además, una inyección de ACD estimula fuertemente el consumo voluntario de ETOH en ratas que prefieren esta droga (Tampier y cols, 2002). De forma similar ACD, es capaz de promover la preferencia por un sitio y la actividad locomotora inducida por ETOH (Correa y cols, 2003a). Con respecto a esta última afirmación, resulta interesante el trabajo publicado por Arrizi-LeFrance en donde se identifica por primera vez una región cerebral, la substancia nigra pars reticulata (SNpr), área que tiene una alta concentración de CAT, en la cual tanto el ACD como el ETOH son capaces de estimular la actividad locomotora de manera similar (Arrizi-LeFrance y cols, 2006). Un resultado similar, se obtuvo con microinyecciones en el núcleo arcuato hipotalámico tanto con ETOH (Pastor y cols, 2008) como con ACD (Correa y cols, 2009a). Esta región también es una de las que contiene más alto nivel de expresión de CAT y un bajo nivel de ALDH y por lo tanto gran acumulación de ACD, se ha observado que la supresión local de AT en esta área

produce una disminución de la locomoción inducida por ETOH y suprime el efecto de la administración periférica de ETOH (Correa y cols, 2009).

Algunos autores (Amit y cols, 1971; Hashimoto y cols, 1989; Heap y cols, 1995; Zimatkin y cols, 1996) han planteado la posibilidad de que el sistema catecolaminérgico cerebral podría estar implicado en la participación del ACD en los efectos inducidos por ETOH en el SNC. De esta forma, las neuronas aminérgicas tendrían una capacidad insuficiente para eliminar ACD, gracias a que la localización de CAT contrasta con la que muestra la ALDH (Zimatkin y cols, 1995), siendo mayor la de la primera en comparación con la segunda, lo que conllevaría a una acumulación local de los niveles de ACD tras la administración de ETOH. Así la localización de CAT en neuronas aminérgicas, pobres en ALDH que llevaría a una acumulación de ACD, se produciría una activación de estas neuronas y consecuente estimulación del consumo de ETOH. Al respecto, estudios electrofisiológicos han demostrado que mediante la modulación de las enzimas que participan del metabolismo central del ETOH se evidencia la importancia del ACD en la activación de las neuronas dopaminérgicas del ATV, por parte del ETOH. Así, la administración intravenosa de ACD como la de ETOH fueron capaces de provocar una activación dosis-dependiente de las neuronas dopaminérgicas del ATV (Foddai y cols, 2004).

Por otra parte, algunos autores han empleado como estrategia alternativa para demostrar la implicancia del ACD en las conductas asociadas a ETOH, los llamados agentes secuestrantes, siendo los más utilizados D-penicilamina y la L-cisteína. Ambos son capaces de inactivar desde el punto de vista farmacológico el ACD, interactuando con el mismo para formar aductos estables e inactivos (Nagasawa y cols, 1980; Kera y cols, 1985). En el caso de la D-penicilamina, estos aductos formados han sido detectados en plasma, hígado y cerebro tras la administración de ETOH (Serrano y cols, 2007). Se ha demostrado que el pretratamiento con D-penicilamina, fue capaz de reducir de modo dosis-dependiente la actividad locomotora inducida por la administración sistémica de ETOH, siendo este efecto selectivo ya que no afectó la estimulación provocada por cocaína o cafeína (Font y cols, 200). Además se observó que con el tratamiento con D-penicilamina, se ven atenuados también los efectos ansiolíticos (Correa y cols, 2008) y el condicionamiento de preferencia a un sitio tras la administración tanto sistémica (Font y cols, 2006b) como intragástrica de ETOH (Peana y cols, 2008). Así también este agente secuestrante fue capaz de producir una disminución del consumo voluntario de ETOH en ratas Long Evans cuando fue

administrado intracerebroventricularmente (i.c.v.) (Font y cols, 2006a). En el caso de la L-cisteína, que al igual que D-penicilamina es un agente secuestrante de ACD, se observó que su administración sistémica fue capaz de disminuir la autoadministración oral tanto de ETOH como de ACD (Peana y cols, 2012).

En relación a lo expuesto anteriormente, Amit y Aragón encontraron que los niveles sanguíneos de CAT en ratas que nunca habían consumido ETOH se correlacionaban positivamente con la preferencia por el consumo de la droga (Amit y cols, 1988). Por lo que podría concluirse que, tanto el incremento en la actividad de la enzima como en los niveles cerebrales de ACD, estarían condicionando un aumento en la preferencia por ETOH, y de esta forma contribuirían a los efectos estimulantes del mismo. Más aún, se ha demostrado que cepas de ratas que prefieren ETOH, denominadas ratas P, tienen mayor actividad de CAT que las que presentan una menor preferencia, ratas no P (Gill y cols, 1996). Al respecto, se ha reportado que los cambios en la actividad de la enzima han sido correlacionados con los observados en la actividad locomotora inducida por ETOH, resultando un incremento de la actividad enzimática de CAT asociado estrechamente a un incremento en la actividad locomotora inducida por ETOH (Correa y cols, 2001). De esta forma, la administración de un inhibidor de la actividad (como el AT) a roedores redujo varios de los efectos asociados al ETOH, como por ejemplo una disminución de la actividad locomotora inducida por ETOH, afectó la duración de la pérdida del reflejo postural, bloqueó el condicionamiento de aversión producido por la droga y redujo el consumo voluntario de ETOH tanto en ratas como en ratones (Correa y cols, 2012).

Estudios que utilizan estirpes de ratones acatalasémicos, demostraron que luego del tratamiento con ETOH tuvieron menor actividad locomotora que los ratones normales (Aragón y cols, 1992b). Además, cuando la cepa de ratones normales fue tratada previamente con AT, se observó una disminución de la actividad locomotora a valores similares a los ratones acatalasémicos que no tuvieron este tratamiento previo (Amit y cols, 1993). Otros autores microinfundieron un vector lentiviral que codifica para una shRNA deprimiendo la síntesis de CAT en el ATV de UChB (ratas bebedoras), una estrategia genética que suprime el consumo voluntario de ETOH en estos animales, mientras que su ingesta aumento en respuesta a la inyección de un vector lentiviral que codifica ADH (Karahanian y cols, 2011).

Estudios realizados en humanos, en donde en un grupo de sujetos voluntarios se examinó la actividad de la CAT sanguínea y el consumo de ETOH, se observó la

presencia de una correlación positiva entre ambos parámetros. Estos datos apoyarían la hipótesis de que la actividad de la CAT podría ser un fuerte predictor positivo en la determinación del consumo de ETOH también en humanos (Koechling y cols, 1992). En la misma línea, se encuentran los estudios realizados relacionando la actividad de la CAT y el consumo de ETOH en sujetos de familias con una historia de alcoholismo (Koeching y cols, 1995) en los que estos individuos se diferenciaban de quienes no tenían una historia de alcoholismo por los niveles de consumo de la droga y la actividad de la CAT.

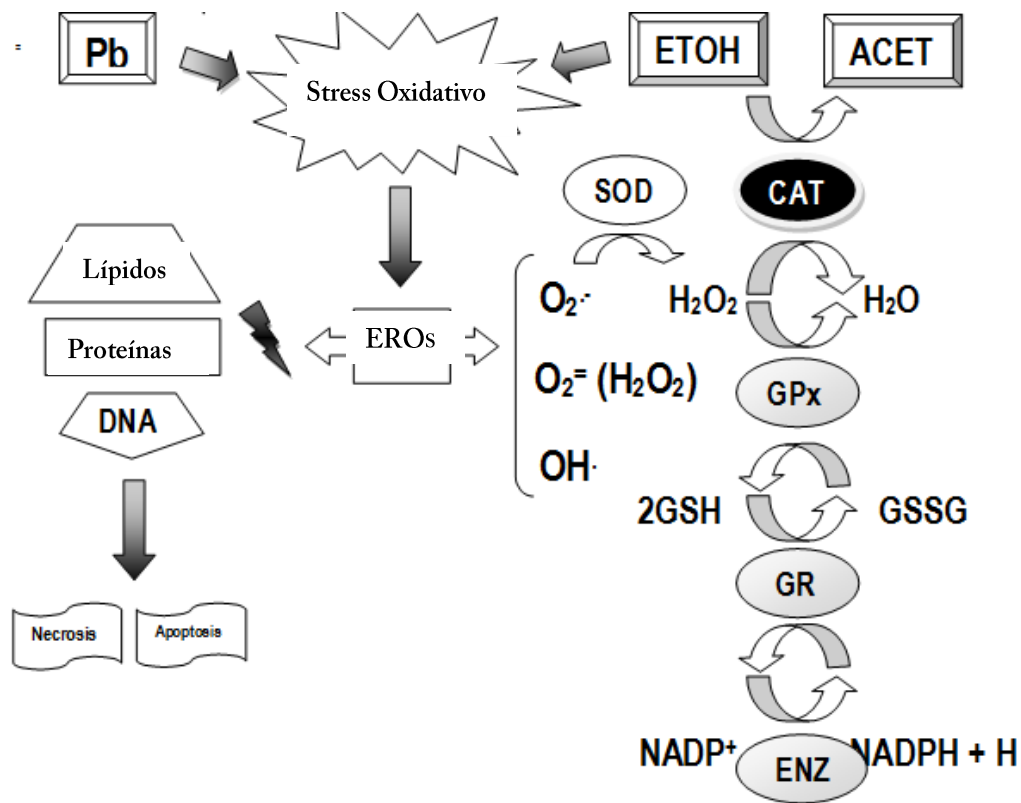
Estas evidencias sugieren que los tratamientos en los que se ha utilizado algún inhibidor de la CAT producen alteraciones conductuales asociadas al ETOH, que podrían ser causadas por la disminución en la formación a nivel cerebral de ACD, lo que podría explicar el papel de la CAT cerebral y del ACD como moduladores de las acciones psicofarmacológicas centrales del ETOH. De esta manera, CAT ha sido relacionada con la respuesta a diferentes conductas asociadas al ETOH, tales como la locomoción, ansiólisis, consumo voluntario, autoadministración, condicionamiento a un sitio entre otros, las cuales, se ha postulado serían mediadas en parte por el ACD, cuya disponibilidad en cerebro como se enunció anteriormente depende principalmente de la oxidación intracerebral por parte de la CAT. Sin embargo, aún no está claro si el efecto que ejerce el ACD es por sí mismo, o por los productos activos de condensación que es capaz de formar. El ACD es una molécula altamente reactiva que puede unirse instantáneamente a dopamina, norepinefrina o epinefrina y condensar con estos neurotransmisores, produciendo compuestos llamados tetrahidroisoquinolinas que podrían ser responsables de algunos de los efectos del ETOH en el SNC (Correa y cols, 2012). Lo que si se ha demostrado claramente es que no sólo este metabolito es psicofarmacológicamente activo a nivel central sino que su génesis es necesaria para que el ETOH manifieste algunos sino todos sus efectos conductuales, y es precisamente en su generación que la enzima CAT adquiere un rol relevante.

#### *Vía de la CAT como sitio común en la interacción entre ETOH y Pb*

Los trabajos más decisivos sobre la interacción entre Pb y ETOH han sido realizados por Correa y cols, en los cuales una inyección aguda de Pb fue usada como mecanismo activador de la enzima CAT con el objeto de evaluar el rol del ACD cerebral sobre diferentes conductas inducidas por ETOH. Resulta interesante destacar que el AT reduce de manera significativa la potenciación que produce el Pb sobre la

actividad de CAT y la hiperlocomoción inducida por ETOH en ratones (Correa y cols, 1992b; Correa y cols, 2000; Correa y cols, 2001). Más aún, en estudios donde se compararon diferentes clases de alcoholes frente a la exposición a Pb, demostraron que sólo el metanol y el ETOH, mostraron un incremento en la actividad de la CAT con el consecuente aumento de la locomoción inducida por ETOH, efectos no observados con el propanol o el ter-butanol que no son metabolizados por la CAT sino por una vía diferente (Correa y cols, 2005). Esto ayudaría a reforzar más la idea de un sitio común en el SNC entre el ETOH y el Pb, en el cual la enzima CAT ejercería un rol fundamental.

En base a estas consideraciones, parecería que la exposición a Pb actúa como activador de CAT, lo cual, no sólo adquiere relevancia como mecanismo de defensa contra un elevado flujo de EROs ocasionado por una situación de estrés oxidativo (como el que producirían tanto Pb como ETOH) sino que tiene importantes implicancias en el metabolismo cerebral de ETOH y en el estudio de sus propiedades adictivas (figura 8). Por todo lo expuesto, resulta relevante la evaluación de la actividad de esta enzima y de su rol en la conducta de consumo de ETOH, lo cual permitirá hipotetizar sobre el inherente rol del ACD en conductas adictivas de esta droga que, hemos demostrado, están modificadas por la exposición temprana a Pb.



**Figura 8:** La exposición a Pb ejercería un efecto activador sobre la actividad de CAT, a través de un mecanismo de defensa contra un elevado flujo de EROs ocasionado por la exposición al metal, lo cual adquiere en el metabolismo cerebral de ETOH y en el estudio de sus propiedades adictivas.

*A partir de las evidencias presentadas se postula que la enzima CAT sería un sitio de acción común entre Pb (que aumentaría su actividad) y ETOH (cuyas altas concentraciones en cerebro inducirían su activación con la consecuente formación de ACD). Así, los animales expuestos a Pb, presentarían incrementada la actividad de la enzima como un mecanismo compensatorio a la generación de EROs, lo cual produciría un incremento del consumo de ETOH. En consecuencia puesto que CAT metaboliza aproximadamente el 60% de ETOH en el cerebro su inhibición, generaría una disminución de este consumo y por el contrario, su activación un incremento, cambios que se interfiere estarían asociados a modificaciones en los niveles de ACD.*



En base a las evidencias presentadas, el OBJETIVO de este capítulo fue por una parte determinar parámetros relacionados con el desarrollo pre y posnatal de las madres y de las crías expuestas a Pb con el propósito de validar el modelo experimental bajo estudio y por otra, indagar sobre el rol de CAT en el elevado consumo de etanol reportado para los animales expuestos perinatalmente a Pb. Para ello, se utilizaron estrategias farmacológicas que permitieron la manipulación de su actividad ya sea a través de su inhibición así como de su sobreactivación mediante la administración de AT y 3NPA respectivamente.

## Materiales y Métodos:

### *Drogas y reactivos*

En esta sección se utilizaron las siguientes sustancias y drogas:

- **Soluciones de ETOH:** se prepararon de manera fresca todos los días de un stock de 96% de ETOH bidestilado (Porta Hnos., Córdoba, Argentina) disuelto en H<sub>2</sub>O filtrada, para lograr las distintas concentraciones utilizadas en los experimentos conductuales (2% al 10%).
- **Sacarosa:** D (+) sacarosa de Biopack S.A, Argentina, la cual se disolvió en H<sub>2</sub>O filtrada en una relación de 1 g por cada 100 ml de solución salina al 0,9%, para alcanzar una concentración final del 1%.
- **Aminotriazol:** 3-amino-1,2,4-triazol (AT) de Sigma Aldrich, (Argentina) se preparó a diario en una solución de salina 0,9% y se inyectó por vía i.p. en una dosis de 250 mg/kg, 5 horas antes del inicio de las últimas sesiones de consumo voluntario.
- **Acido 3-nitropropiónico:** (3NPA) de Sigma Aldrich (Argentina) se preparó a diario en salina 0,9% y fue administrado por vía subcutánea (s.c.) a diferentes dosis: 10 mg/kg, 20 mg/kg y 30 mg/kg, y 15 min, 30 min ó 45 min antes del inicio de la sesión de consumo voluntario.

### *Inhibidores de CAT: 3-amino-1, 2,4 triazol (AT)*

El AT, es un herbicida no selectivo que produce una lenta inhibición irreversible de CAT al reaccionar con el complejo I CAT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo a la siguiente reacción:

Compuesto I + AT  $\longrightarrow$  inhibición irreversible de CAT.

Los estudios realizados *in vivo* demuestran que el AT (a una dosis de 1 g/kg) produce una inhibición en CAT cerebral, renal y hepática en respuesta a distintas vías de administración: i.p, intravenosa y oral, así como en diversas especies de animales: ratas, perros y ratones (Heim y cols, 1955; Nelson y cols, 1956; Ishi y cols, 1977 a; Rettze y Settz, 1985). La reacción entre el compuesto I y el AT produce la pérdida de la actividad catalítica y la destrucción de la proteína por lo que se requiere de nueva síntesis de la enzima para recuperar dicha actividad (Margolis y cols, 1960).

Por otra parte, la inactivación de la actividad de CAT cerebral es dependiente de los niveles de  $H_2O_2$  (Margolis y cols, 1960; Thephly y cols, 1961), ya que se ha demostrado que el AT falla en reducir la actividad de la CAT en sangre cuando no hay adecuados niveles del mismo necesarios para que la droga sea capaz de ejercer su efecto (Aragón y cols, 1991). Sin la presencia de  $H_2O_2$ , la inhibición que produce es menor, mucho más lenta y reversible, y sólo después de una incubación prolongada (Margoliash y Novogodsky, 1958; Thephl y cols, 1961; Hem y cols, 1956). Por el contrario un incremento en la producción de  $H_2O_2$ , podría potenciar la inhibición mediada por AT sobre el sistema enzimático (Zhang y Piantodosi, 1991). En concordancia con esto Aragón y cols (Aragón y cols, 2002) demostraron que la exposición a hiperoxia, incrementa la habilidad del AT de reducir tanto la actividad de CAT cerebral así como la locomoción inducida por etanol en ratones.

En relación a estudios conductuales y bioquímicos destinados a evaluar la implicancia de CAT en los efectos del ETOH, AT ha sido uno de los inhibidores más usados. Se ha demostrado que el pretratamiento con este inhibidor y con la consecuente disminución de la actividad de CAT cerebral en roedores bloquea o atenúa diferentes conductas inducidas por ETOH como: condicionamiento aversivo al sabor (Aragón y cols, 1985), actividad locomotora (Aragón y cols, 1989; Aragón y Amit, 1993), tiempo de narcosis y letalidad (Aragón y cols, 1991a; Tampier y cols, 1988), ansiólisis en un test de laberinto en cruz (Font y cols, 2008) condicionamiento a un sitio previa administración con ETOH (Font y cols 2008), consumo de ETOH en ratas (Aragón y Amit, 1992; Tampier y cols, 1994; Rotzinger y cols, 1994) y en ratones (Koechling y Amit, 1994), y liberación de corticosterona producida por ETOH (Aragón y Amit, 1987). Se ha demostrado que estos efectos son específicos para ETOH, ya que el

AT no fue capaz de atenuar conductas inducidas por otras drogas, como por ejemplo cocaína y morfina (Aragón y cols, 1985; Quintanilla y cols, 1980). Se ha demostrado que la inhibición que produce el AT sobre el consumo voluntario y la actividad locomotora inducida por ETOH es dosis dependiente (Aragón y Amit, 1992; Rotzinger y cols, 1994), de la misma forma que el efecto que ejerce sobre la actividad de la CAT cerebral (Aragón y cols, 1991c). En este sentido, mientras dosis bajas de AT (0,01; 0,03; 0,06 g/kg) no disminuyen la actividad locomotora inducida por ETOH (1,6 g/kg), sí se observa esa disminución sobre estos efectos del ETOH en la actividad locomotora ante altas dosis de AT (0,125; 0,250 y 0,5 g/kg).

Con respecto a la evaluación temporal entre el tratamiento con AT y la actividad locomotora inducida por ETOH se ha demostrado que el intervalo óptimo entre los tratamientos es el de 5 h, que coincide con el tiempo de máxima inhibición en la actividad de CAT cerebral por el AT. Se ha observado una disminución de la actividad de CAT cerebral de un 85-95%, tanto en ratas como en ratones, con respecto a animales inyectados con salina 4 h después de una inyección i.p de AT (0,5 y 1 g/Kg) en tanto que 20 h después de su administración los valores retomaron a sus parámetros normales (Aragón y cols, 1985a, 1989,1991c).

#### *Activadores de CAT: Acido 3 nitropropiónico (3NPA)*

El acido-3-nitropropiónico (3NPA), es una micotoxina que causa neurotoxicidad tanto en animales como en humanos (Ludolph y cols,1991) al producir una inhibición irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), la cual forma parte del complejo II de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Como resultado de esta inhibición, se produce disfunción mitocondrial, se observa depleción de ATP, la célula pierde su capacidad de regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular y se produce como consecuencia un incremento de la producción de EROs que son altamente perjudiciales para el organismo (Alexi y cols, 2000). Este deterioro que genera el 3NPA en la función mitocondrial, se extiende a todos los tejidos del cuerpo, incluyendo el SNC (Goulg y Agustina, 1982).

Se ha demostrado que el 3NPA puede atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que se ha empleado su administración sistémica en ratas, ratones y primates no humanos en distintos modelos experimentales. Para su administración se pueden utilizar ya sea tanto bombas osmóticas, subcutánea directa o incluso i.p.; sin embargo, debido a su toxicidad la dosis empleada depende de la cepa de animales utilizada. Por ejemplo se

sabe que las ratas Fisher son más susceptibles que las ratas Lewis, que parecen perder la susceptibilidad al 3NPA, pero se ha demostrado que con la dosis adecuada muestran lesiones y déficit conductual (Ludolph y cols, 1991). Las lesiones cerebrales que son causadas por la administración sistémica del 3NPA, tienen como blanco principal el estriado debido a su elevada concentración de SDH, aunque también se han encontrado en hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan y cols, 1997), por lo que ha sido utilizado ampliamente en el modelo de Huntington experimental (Beal y cols, 1993; Borlongan y cols, 1997; Beal y cols, 1999). Así, el 3NPA es capaz de conducir a la muerte neuronal por el mecanismo que involucra la inhibición de SDH, (Túnez y cols, 2004). Al respecto, se ha demostrado en cultivo de neuronas hipocampales que induce una rápida necrosis en algunas neuronas y apoptosis tardía en otras (Pang y cols, 1997). Bajo estas condiciones, niveles basales de glutamato extracelular generan muerte neuronal por necrosis y este efecto es mediado por el receptor NMDA (Pang y cols, 1997; Beherens y cols, 1995). Estudios recientes han sugerido la participación de EROs y procesos de estrés oxidativo en la neurotoxicidad inducida por 3NPA (Ates y cols, 2007; Binienda y cols, 2001; Fricker y cols, 2008). Al respecto dos trabajos del grupo de Binienda (Binienda y cols, 1997; Binienda y cols, 1998) reportaron un incremento de la actividad enzimática de CAT en hipocampo y caudado putamen en ratones tratados con 3NPA luego de 90 min, en comparación con ratones tratados con solución salina, seguido de su disminución luego de 120 min de administrado. Esto fue revertido cuando los animales fueron tratados previamente con L-carnitina, un potente antioxidante (Binienda y Ali, 2001).

Interesantemente, Manrique empleando el 3NPA relacionó la elevación de la actividad enzimática de CAT con la hiperlocomoción inducida por ETOH (Manrique y cols, 2006). En este trabajo se reportó que ratones pre-tratados con 30 y 45 mg/kg de 3NPA, mostraron niveles elevados de actividad locomotora inducida por ETOH, aunque sólo en la dosis de 45 mg/kg se observaron efectos estadísticamente significativos; es decir, que una inyección sistémica de 3NPA fue suficiente para potenciar el efecto del ETOH sobre la locomoción. El estudio de la curva temporal para esta interacción, mostró que 3NPA incrementó la actividad locomotora de manera máxima en los 90 min posteriores a su administración (Manrique y cols, 2006).

*Animales y tratamiento perinatal: protocolo de exposición al Pb*

Para todos los estudios se usaron ratas Wistar macho de 35 y 63 días de edad, nacidas y criadas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Estas crías provinieron de madres expuestas a una solución de acetato de Pb, de acuerdo al protocolo que fue descrito por Virgolini y cols (Virgolini y cols, 1999). Brevemente, ratas hembras adultas fueron divididas en un grupo control (grupo C) que recibió agua corriente filtrada como única fuente de líquido y un grupo Pb (grupo Pb) que recibió una solución de 220 ppm de Pb en el agua de bebida (0,4 g/L de Pb). Cabe destacar que durante el período de exposición los animales tuvieron acceso ilimitado tanto a la bebida como a la comida y fueron mantenidos en condiciones de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) y humedad constante respetando un ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad. Para el proceso de apareamiento, hembras (250-300 g) fueron colocadas en cajas con machos en una relación 3/1 durante 3-4 ciclos estrales (aprox. 15 días). Subsiguientemente, las hembras preñadas fueron pesadas y observadas hasta determinar el momento del nacimiento de las crías que fue considerado como el día postnatal (DPN1). Dentro de las 24-48 h de producido el alumbramiento se procedió a ralea las crías, limitando a 8 animales por camada, manteniendo la mayor cantidad posible de machos y conservando siempre al menos una hembra. El destete se realizó el día postnatal 25 (DPN25), momento en que las madres y las crías hembras fueron descartadas y los machos hospedados en grupos en cajas, siendo la solución de Pb reemplazada por agua corriente filtrada (final de la exposición a Pb).

Durante el período en el cual los animales estuvieron expuestos a Pb, se registró en las madres la ingesta de fluidos (agua corriente filtrada o Pb), la ganancia de peso durante la gestación y la duración de la gestación. En las crías, se determinó el tamaño de cada camada, la proporción de crías hembras y machos y el peso de estas crías durante el período de tratamiento perinatal.

Todos los procedimientos y manipulaciones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas por la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH- National Institute of Health) de Estados Unidos de América, aprobada por el comité de cuidado y uso de animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados.

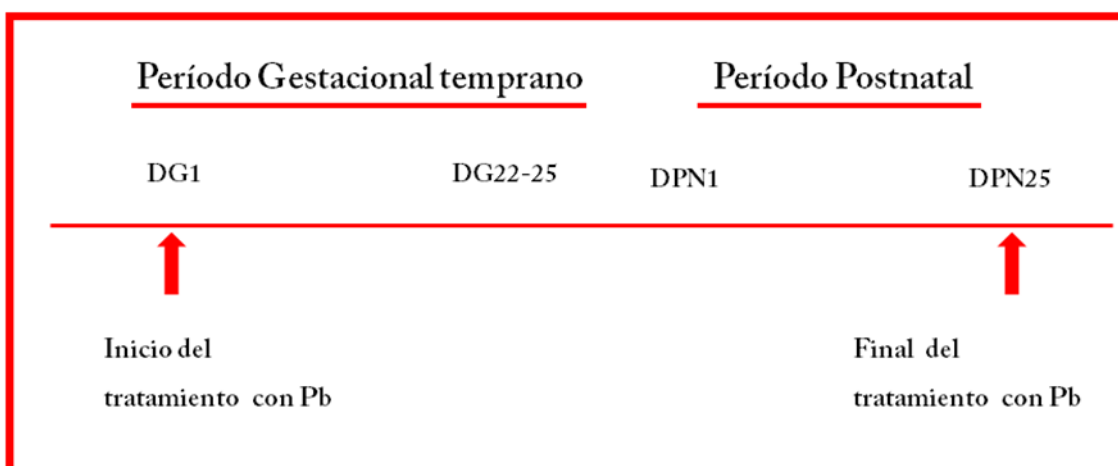


Figura 3: Esquema de exposición al Pb durante la gestación y lactancia. DG= día gestacional; DPN= día postnatal.

### *Niveles de Pb en sangre*

Se determinó el nivel del metal en sangre (plombemia) utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica marca Pekin Elmer Analyst 600 equipado con horno de grafito cr-90 (Buck 200gf Científica) de acuerdo con Subramedian y Meranger, 1981. Se procedió de la siguiente manera: a un tubo que contenía 100  $\mu$ l de agua y 100  $\mu$ l de sangre entera heparinizada se le agregó 100  $\mu$ l de una mezcla de APDC/Tritón (5 ml APDC 2% + 0,25 ml Tritón), se lo agitó por 60 seg y se le agregó 100  $\mu$ l de MIBK agitando nuevamente durante 60 seg. Esta solución fue centrifugada por 5 min a 1008 g y se leyó la fase acuosa superior. Estas mediciones fueron realizadas por personal perteneciente al ISIDSA. Se usaron estándares de concentración conocida a los cuales se refirieron las lecturas obtenidas. El límite de detección de la técnica fue de 0,75  $\mu$ g/dl y el de cuantificación de 1,80  $\mu$ g/dl. Los grupos en los cuales se realizaron las determinaciones fueron: animales de 35 días de edad (DPN35), de 63 días de edad que consumieron ETOH (DPN63 ETOH) y un grupo de la misma edad que no consumió ETOH (DPN63 noETOH).

### *Hemoglobina en sangre*

Una alícuota adicional de sangre entera fue usada para la determinación de hemoglobina (Hb) de acuerdo al método de Drabkin, en los siguientes grupos: DPN35, DPN63 ETOH y DPN63 noETOH. Estos valores de hemoglobina fueron determinados ya que como se mencionó con anterioridad, una de las manifestaciones toxicológicas más características de la intoxicación con Pb es el desarrollo de anemia. El método utilizado consistió en añadir 20 µl de sangre homogeneizada a un tubo conteniendo 5 ml de solución de Drabkin (Ferricianuro potasio  $K_3Fe(CN)_6$  200 mg; cianuro potasio CNK 50 mg; fosfato monopotásico  $KH_2PO_4$  140 mg; detergente no iónico 1 ml; agua destilada hasta 1000 ml). Se esperó un mínimo de 5 min para producir una hemólisis total y completar la transformación de toda la hemoglobina en ciano metahemoglobina. Se leyó la absorbancia de la solución a 540 nm frente a blanco de agua destilada y de reactivo de Drabkin. La concentración de hemoglobina fue calculada en función de un estándar de concentración conocida: 15,6 g/dl (HemogloWiener, Argentina).

### *Consumo voluntario de ETOH:*

*Raciocinio:* El consumo voluntario de ETOH, que involucra un paradigma de libre elección entre ETOH y  $H_2O$ , es ampliamente usado para estudiar las propiedades motivacionales de ETOH en animales de laboratorio con aplicabilidad en seres humanos. Es una conducta consumatoria, en donde el animal determina no sólo cuándo tiene acceso al ETOH sino también la cantidad que va a consumir (Hungund y cols, 2003; Little y cols, 1999). Se le presenta al animal diariamente dos botellas, una con  $H_2O$  y otra con una solución de ETOH. Se registra el volumen consumido de cada botella, y se calcula el índice de preferencia por ETOH, basado en la proporción de ETOH ingerido en relación con el volumen total de líquido consumido. En el modelo usado en esta tesis el animal puede optar por consumir diariamente  $H_2O$  ó ETOH durante un intervalo de tiempo limitado a 2 h durante el ciclo de luz. La limitación del consumo a 2 h por día pretende inducir en estos animales una conducta de ingesta de ETOH compulsiva denominada en inglés “*binge drinking*” que reproduciría con mayor realismo los patrones de consumo de los adolescentes.

Otra consideración importante a tener en cuenta en los modelos de consumo voluntario de ETOH, es que los roedores pueden llegar a desarrollar aversión al sabor

del ETOH. Además cuando la concentración de ETOH alcanza valores superiores al 10% entran en juego cuestiones metabólicas que producen una acumulación periférica de ACD generando aversión por su consumo. Por esta razón, deben utilizarse estrategias para contrarrestar esa aversión y que el animal consuma ETOH por sus propiedades reforzantes y no por su sabor. Esto puede lograrse mezclando el ETOH con una solución palatable como la sacarosa y presentarle al animal soluciones con concentraciones crecientes de ETOH, a medida que se reducen las de la solución apetitiva (Samson y cols, 1986; Waller y Lorch, 1978). Otra opción es ofrecer ETOH a los animales a concentraciones bajas, e ir aumentando gradualmente dicha concentración a lo largo de los días (Pennington y Myers, 1991). Esta última alternativa fue seleccionada para esta tesis, aumentando progresivamente cada 4 días la concentración de ETOH. Además se tuvo la precaución de alternar todos los días la posición de las botellas para evitar el condicionamiento a un lugar que podría modificar la preferencia de los animales.

Asimismo cabe destacar que este paradigma conductual ha sido ampliamente utilizado para evaluar la implicancia del sistema enzimático oxidativo del ETOH en los efectos motivacionales de la droga. Esto se ha demostrado en diferentes cepas tanto de ratas como de ratones (Koechling y Amit, 1994), además en animales seleccionados genéticamente por su alta preferencia de ETOH (Tampier y cols, 1995).

*Procedimiento:* El día previo al inicio del paradigma de libre elección ETOH/H<sub>2</sub>O un grupo de animales machos de 35 días de edad fue sacrificado para obtener sangre y tejido cerebral. Otro grupo de animales de la misma edad fue pesado, alojado en pares (para evitar el efecto estresor del aislamiento) y restringido al acceso de líquido durante las 24 h previas al inicio del esquema de consumo voluntario, para habituar a los animales a un consumo diario limitado. El raciocinio para la elección del período periadolescente se basa en resultados previos, así como evidencias experimentales que indican que cepas de ratas que naturalmente prefieren el ETOH inician el consumo en la adolescencia, lo cual condiciona efectos a largo plazo manifestados como mayor autoadministración y mayor recaída (*“relapse”*) en el consumo abusivo de la droga (McBride y cols, 2005). El protocolo consistió en la presentación durante 2 h diarias (de 13:00-15:00 h) de 4 probetas graduadas conteniendo H<sub>2</sub>O o una solución de ETOH en concentraciones crecientes de acuerdo al siguiente esquema (expresado en v/v): días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días 13-16: 8%; días 17-28: 10% de ETOH. La ingesta



de ETOH y de H<sub>2</sub>O se registró diariamente y se expresó como gamos de ETOH por kilogramo de peso corporal, mientras que la proporción de consumo ETOH/H<sub>2</sub>O se expresó como % de preferencia. A tal fin los animales fueron pesados cada 4 días registrándose el aumento de peso. Una vez que la ingesta de ETOH se estabilizó al 10% (día 21), los animales fueron asignados a uno de los siguientes tres grupos, de acuerdo a la droga y al esquema de inyección de la misma: a) solución salina (SAL: días 21 a 28), b) AT i.p. (inhibidor de la actividad de CAT): días 21 a 28 y c) 3NPA s.c. (activador de CAT): días 24 a 28.

En concordancia con datos reportados por la bibliografía, AT fue administrado 5 h antes en una dosis diaria de 250 mg/kg y durante 8 días para asegurar una completa inhibición de la enzima. En relación a 3NPA, es importante aclarar que la selección de la dosis y el momento de la inyección se basó en los reportes de la literatura (Binienda y cols, 1998. Manrique y cols., 2006), y en experiencias pilotos de estudios dosis/respuesta realizadas por nosotros. Se determinó de esta manera que la dosis de 20 mg/kg, administrada 105 min antes de que los animales fueran sacrificados es la que produjo una máxima ingesta de ETOH asociada a un incremento de CAT y con menor daño neurotóxico. Asimismo, la administración se restringió a los últimos 4 días de la prueba para minimizar la neurotoxicidad de la droga.

Al final de la última sesión de consumo voluntario de ETOH (en el día 28 y limitada a 1 h de duración), los animales fueron anestesiados con éter y la sangre extraída por punción cardíaca. Posteriormente fueron decapitados y se disecaron áreas cerebrales (corteza prefrontal, estriado, núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo y cerebelo) para determinar la actividad enzimática de CAT. Como controles de la misma edad, fue sacrificado otro grupo de animales que no estuvo sometido al paradigma de consumo voluntario de ETOH y que fue administrado con las mismas drogas que el grupo ETOH (DPN63 noETOH).

En consecuencia, quedaron conformados los grupos experimentales que se detallan a continuación:

- *Grupo 35d (C y Pb)*: en el cual las crías fueron sacrificadas a los 35 días de edad (DPN35). Este grupo revela la funcionalidad basal de los parámetros a evaluar en animales periadolescentes (previo al inicio del esquema de consumo de ETOH). En este momento, los niveles de Pb aún son detectables en sangre (ver resultados capítulo I) y se encuentran en una fase dinámica de movilización a los tejidos blandos.

- *Grupo 63d ETOH SAL (C y Pb)*: crías sacrificadas al final del consumo de ETOH (DPN63 ETOH-SAL) luego de ser inyectadas a diario con solución salina durante 8 días. Este grupo refleja las modificaciones producidas por el consumo crónico de ETOH en animales adultos cuyos niveles de Pb en sangre son indetectables, pero en los que el metal se encontraría depositado transitoriamente en tejidos blandos.
- *Grupo 63d ETOH AT (C y Pb)*: crías sacrificadas al final del consumo de ETOH luego de ser inyectadas a diario con AT durante 8 días (DPN63 ETOH-AT). Este grupo refleja el efecto del bloqueo de la enzima CAT sobre el consumo crónico de ETOH en animales adultos.
- *Grupo 63d noETOH AT (C y Pb)*: crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de ETOH y a las que se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron ETOH voluntariamente, y que fueron inyectadas con AT (DPN63 noETOH-AT), siguiendo el mismo esquema de administración que los animales sometidos al paradigma de consumo. Este grupo refleja los efectos de las manipulaciones farmacológicas en la actividad de la CAT en animales que no han consumido ETOH.
- *Grupo 63d ETOH 3NPA (C y Pb)*: crías sacrificadas al final del consumo de ETOH luego de ser inyectadas a diario con 3NPA durante 4 días (DPN63 ETOH-3NPA). Este grupo refleja el efecto de la sobreactivación de la enzima CAT sobre el consumo crónico de ETOH en *animales adultos*.
- *Grupo 63d noETOH 3NPA (C y Pb)*: crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de ETOH y a las que se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron ETOH voluntariamente, y que fueron inyectadas con 3NPA (DPN63 noETOH-3NPA), siguiendo el mismo esquema de administración que los animales sometidos al paradigma de consumo. Este grupo refleja los efectos de las manipulaciones farmacológicas en la actividad de la CAT en animales que no han consumido ETOH.

- Grupo 63d noETOH (C y Pb): crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de ETOH y a las que se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron ETOH voluntariamente (DPN63 noETOH-SAL). Este grupo se usó como control de los grupos adultos.

En los esquemas presentados a continuación (figura 9) se puede observar en la línea de tiempo el momento en el que se realizaron los experimentos involucrados en este capítulo:

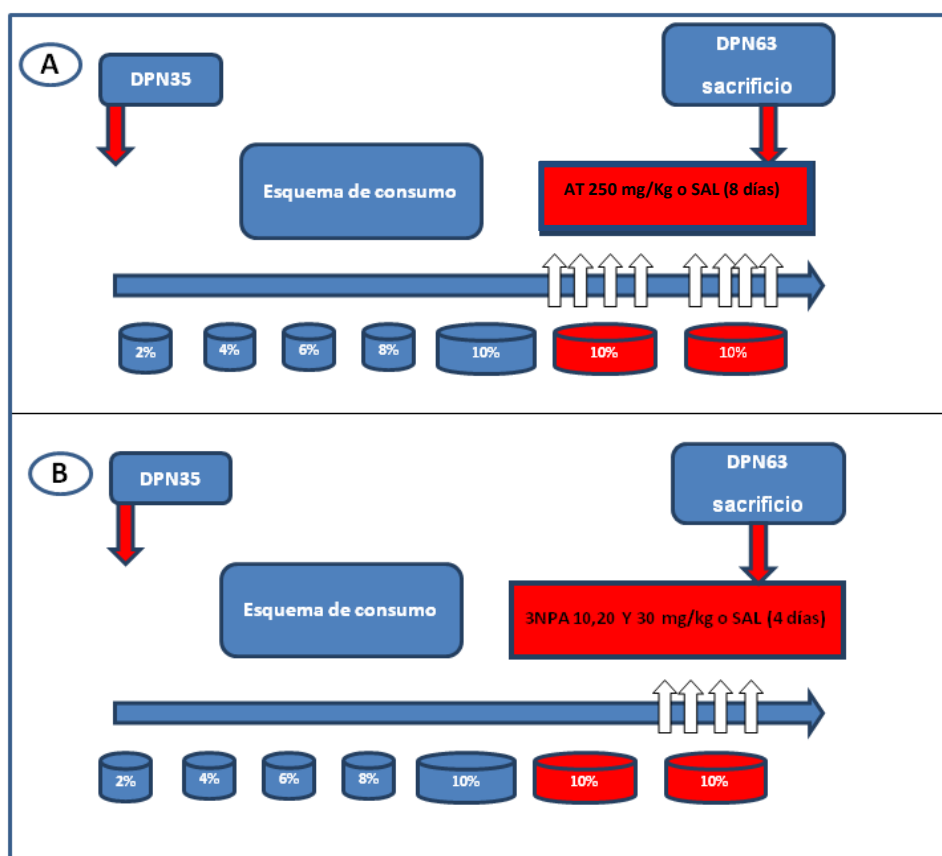


Figura 9: Esquema de administración de drogas empleadas en este capítulo. A) Administración de AT durante 8 días y B) administración de 3NPA durante 4 días.

#### *Curva dosis/respuesta de 3NPA:*

Se realizaron experimentos piloto para determinar la dosis y el tiempo de administración de 3NPA en la conducta de consumo voluntario de ETOH. Además, dado que como se explicó anteriormente es una neurotoxina que resulta pertinente evaluar si la dosis utilizada es capaz de producir una neurotoxicidad importante que

podiera influenciar nuestros resultados. El consumo de ETOH y la actividad de CAT se determinaron en las dosis de 10, 20 y 30 mg/kg 3NPA administrado en forma crónica.

Asimismo, sólo para la dosis de 20 mg/Kg, se realizó una curva temporal para determinar el tiempo correcto de administración de 3NPA previo al esquema de consumo voluntario. En la figura 10 se observa el esquema empleado para esta dosis.

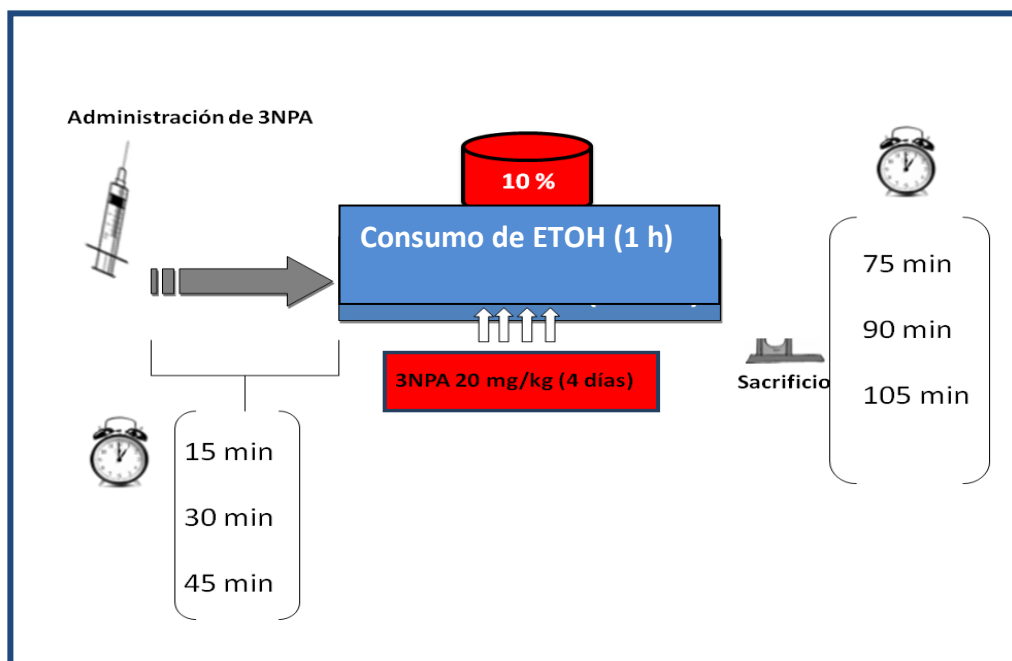


Figura 10: Curva temporal para la administración de 3NPA: Administración s.c. 15, 30 y 45 min antes del esquema de consumo voluntario de ETOH (de 1 h de duración) y sacrificio de los animales inmediatamente después.

### Consumo de sacarosa:

Se evaluó la ingesta total de sacarosa, una sustancia palatable, con el objetivo de determinar y evaluar si la exposición al Pb durante el desarrollo, fue capaz de modificar las propiedades motivacionales a reforzadores naturales (comida, agua, sexo) y de esta forma comprobar que si los efectos observados de AT y 3NPA sobre el consumo de ETOH, fueron exclusivos del ETOH y no se extendieron a otros reforzadores. Específicamente se registró el consumo de sacarosa al 1%, una sustancia que es altamente apetecible considerada un reforzador natural siguiendo un protocolo empleado en nuestro laboratorio (Zurita y Molina, 1999). Un grupo de crías machos de 35 días de edad fueron hospedadas de a dos y restringidas al consumo de liquido durante 24 h antes del inicio del esquema de consumo. Al día siguiente se les presentaron cuatro

probetas, y la opción de beber durante 2 h H<sub>2</sub>O o una solución de sacarosa al 1%, durante 12 días. Se registró la ingesta diaria de ambos fluidos y los resultados se expresaron como % de preferencia de sacarosa en relación a H<sub>2</sub>O. Durante los días 1-4, se consideró la ingesta de sacarosa como basal, y a partir del día 5-12, se inyectó un grupo de animales con SAL (DPN63 ETOH-SAL), en tanto que un segundo grupo fue administrado con 250 mg/kg i.p. de AT, 5 h antes del inicio del esquema de libre elección (DPN63 ETOH-AT) y otro grupo administrado con 20 mg/kg 3NPA s.c. 45 min antes del consumo (DPN63 ETOH-3NPA).

#### *Actividad locomotora:*

*Raciocinio:* Los efectos del ETOH sobre la actividad locomotora en animales de laboratorio, dependen fundamentalmente de la especie animal en cuestión, así como de la dosis y la vía de administración. El ETOH administrado sistémicamente, es capaz de generar efectos estimulantes locomotores en la mayoría de las cepas de ratas y ratones (Colombo y cols, 1998; Rodd y cols, 2004), excepto en algunas como por ejemplo los C57/BL6 (Correa y cols, 2004b). Por otra parte, se ha demostrado que la administración i.c.v. de ETOH a dosis pequeñas o moderadas es capaz de estimular la actividad motora en ratas (Correa y cols, 2003a). Un efecto similar se observó cuando esta administración es localizada en determinadas regiones del SNC, como por ejemplo en la SNpr (Arizzi-LaFrance y cols, 2006), región cerebral en la que confluyen diferentes sistemas de neurotransmisores (como dopamina y GABA) que interactúan para regular la actividad motora del animal (Mayorga y cols, 1999; Trevit y cols, 2002). Además, es una región rica en CAT, en la que el ETOH, tras su administración localizada, podría convertirse en ACD (McKenna y cols, 1976; Brannan y cols, 1981; Moreno y cols, 1995; Zimatkin y Lindros, 1996). Otra zona implicada en la mediación de las propiedades estimulantes del ETOH es el núcleo arcuato hipotalámico, en el cual el ETOH puede actuar de manera dosis dependiente para producir también una clara activación motora en los animales (Pastor y cols, 2008).

En base a la teoría que propone que la estimulación sobre la actividad locomotora inducida por ETOH es un reflejo de las propiedades estimulantes y reforzantes de la droga (Wise y Bozarth, 1987), nos propusimos evaluar si la cantidad de ETOH ingerido en el esquema de consumo voluntario fue suficiente para inducir un aumento en la actividad locomotora en las ratas expuestas a Pb, con el fin de aportar

nuevas evidencias a los mayores efectos motivacionales/reforzantes del ETOH observados en estos animales.

*Procedimiento:* La actividad locomotora fue determinada, mediante la utilización de aparatos denominado actógrafos. Consisten en 8 cajas rectangulares (30 x 19 x 46 cm) equipadas con dos fotocélulas de rayos infrarrojos localizados 3 cm por encima del piso. La interrupción de cualquier haz de luz (rayo infrarrojo) resulta en una cuenta en la fotocélula, que se traduce en una computadora conectada a una interfase. El aparato está ubicado en una habitación equipada con un tubo de luz fluorescente de 350-400 lux de intensidad, separada del sitio donde residen los animales de manera permanente y libre de ruido.

Durante la última sesión de ingesta voluntaria, en el DPN63 (día 28 y de 1 h de duración), los animales fueron monitoreados en los actografos, durante 1 h en intervalos de 10 minutos. Otro grupo de animales, designado como DPN63 noETOH, fue monitoreado bajo las mismas condiciones como grupo control de los animales adultos. Adicionalmente otro grupo de crías machos fue sometido también a la prueba en el DPN35. Es importante destacar que todos los animales fueron habituados previamente tanto a la habitación como a las cajas del aparato locomotor, durante el día anterior al experimento para su libre exploración durante 1 h (datos que no fueron registrados).

### *Alcoholemia*

Se midieron además los niveles de ETOH en muestras de sangre tomadas 15 minutos después de finalizado el consumo voluntario el día 28 del esquema de ingesta (DPN63 ETOH-SAL, DPN63 ETOH-AT y DPN63 ETOH-3NPA). La elección del tiempo de extracción estuvo relacionada con la cinética del ETOH sobre la base de datos obtenidos de la bibliografía y de estudios previos realizados por nosotros (Virgolini y cols, 1999). Se utilizó para medir la alcoholemia o “*blood alcohol concentration*” (BAC), como se describe en Pepino y cols 2002 (Pepino y cols, 2002), un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard modelo 5890, Palo Alto, CA, EE.UU.) con butanol como patrón interno. Los resultados se promediaron para cada muestra y se expresaron como mg de ETOH/dl de sangre. Estas mediciones se realizaron por parte del personal del Instituto Ferreyra.

*Actividad de CAT:*

La actividad enzimática de CAT se evaluó mediante técnicas espectrofotométricas de acuerdo al método de Aebi (Aebi, 1984) con ligeras modificaciones. Se determinó la actividad tanto en glóbulos rojos como en las aéreas cerebrales mencionadas sobre la base de reportes previos que demuestran que la actividad de la enzima no está distribuida homogéneamente en el SNC (Zimatkin y cols, 1999).

Las áreas fueron disecadas y homogeneizadas en 100  $\mu$ l de buffer TRIS-HCl 0.01 M pH=7,4 (200  $\mu$ l para cerebelo) conteniendo 100  $\mu$ l/ml de un inhibidor de proteasas y fosfatasa y centrifugadas a 9158 g durante 10 min a 4°C. Una alícuota del sobrenadante se usó para determinar la actividad de la enzima y el resto para la medición de proteínas mediante un kit comercial basado en el método de Bradford (BioRad Bradford Protein Assay Kit, Hércules, CA, USA). Se midió la actividad de CAT utilizando un espectrofotómetro Varian Cary 50. Este método se basa en el seguimiento de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se observa con el decremento en la absorbancia a una longitud de onda de 240 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados a unidades de actividad/min/ml/mg de proteína mediante la siguiente fórmula (en la cual se ha considerado el coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$\frac{\Delta \text{ Abs/min} \times V \text{ cubeta}}{40 \times V \text{ muestra} \times \text{mg proteína} \times 100} = \text{U CAT/mg prot/min/ml}$$

El procedimiento empleado consistió en colocar en una cubeta 1,25 ml de buffer fosfato 50 mM (pH=7) al que se agregó 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 mM y 25  $\mu$ l de la muestra de tejido. Se tomaron mediciones cada 1 min durante 10 min.

En el caso de la determinación de CAT eritrocitaria, posteriormente a la determinación de Hb, la sangre entera restante fue centrifugada a 573 g durante 10 min; el plasma separado y los eritrocitos lavados 3 veces con solución fisiológica y congelados a -20 °C. En el momento de la determinación, el paquete eritrocitario fue hemolizado 1/10 con H<sub>2</sub>O destilada y diluido posteriormente 1/200 con buffer fosfato 50 mM, resultando una dilución final de 1/2000. La determinación de CAT se realizó siguiendo el método de Aebi descrito anteriormente. Los valores obtenidos se expresaron como unidades de actividad enzimática (UE) /min/g de Hb de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta \text{Abs} \times 10^6 \times 1,375 \times 100}{40 \times \text{Volumen de muestra (ml)}} = X_1$$

$$X_1 \times 100 (\text{factor de dilución}) = X_2$$

$$U \text{ CAT /g Hb} = X_2 / \text{Hb (g/dl)}$$

Se considera a una unidad enzimática como la cantidad de CAT que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /min a pH=7 y a 25 °C.

La actividad de la enzima se determinó al inicio y al final del consumo voluntario de ETOH en animales que consumieron ETOH, así como en sus controles respectivos no ETOH en respuesta al inhibidor y al activador de la actividad de CAT, AT y 3NPA, respectivamente.

### *Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo*

*Raciocinio:* Como consecuencia de que el 3NPA, es una neurotoxina ampliamente utilizada para inducir la enfermedad de Huntington, que afecta principalmente a neuronas del estriado (Genee y cols, 1998), se analizó dicha estructura en los diversos grupos con el objeto de seleccionar la dosis en donde se observara menor neurotoxicidad asociada con una mayor actividad de CAT y consumo voluntario de ETOH.

*Procedimiento:* En esta técnica también conocida como tinción de Nissl, se utilizan colorantes acidófilos como el violeta de cresilo para observar la distribución y morfología de neuronas en el SNC. Este colorante se une al ARN contenido en los ribosomas, por lo que va a teñir el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso de neuronas, en tanto que en las células gliales se tiñen únicamente los núcleos.

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (16%, 400 mg/kg i.p.) y perfundidos de manera intracardíaca con 0,9 % de solución salina y 4% de paraformaldehído (PFA, pH=7,4) durante 1 h, a una velocidad de 15 ml/min (mediante una bomba MasterFlex, Modelo 77200-20). Sus cerebros fueron extraídos y posteriormente congelados y cortados en secciones de 40  $\mu\text{m}$  usando un criostato Leica. Se montaron los cortes en portaobjetos tratados con gelatina Albrecht (1,5% de gelatina, 80% alcohol). Luego se procedió a exponer los cortes montados durante un período de entre 5 a 10 min de exposición al colorante, violeta de cresilo (Sigma, Argentina)



preparado al 0,5 % p/v, pH=3,9 y luego a una fase de aclarado y deshidratación. Para aclararlos se sumergieron los cortes en un baño de H<sub>2</sub>O destilada durante unos segundos e inmediatamente después se deshidrataron, sumergiéndolos en cubetas sucesivas con soluciones de alcoholes de graduación ascendente hasta llegar al alcohol absoluto. Finalmente se utilizó un disolvente orgánico como el xilol para facilitar su conservación y montaje con DPX (Sigma, Argentina). Los cortes fueron observados a una magnificación de 2,5x y 40x y las células contadas a 40x promediando 4 campos de 16 pulgadas<sup>2</sup> usando el programa de uso libre IMAGE J (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, NIH). Se seleccionaron 2 cortes de estriado y posteriormente se obtuvo un valor final promedio de estos conteos para cada unidad de experimentación.

### **Análisis estadístico:**

Los valores de plumbemia obtenidos en sangre no pudieron ser comparados estadísticamente puesto que muchos cayeron por debajo del nivel de cuantificación. Los niveles de hemoglobina en sangre fueron analizadas mediante la prueba t de Student.

Para facilitar la interpretación del análisis estadístico, los datos diarios de la ingesta de ETOH se dispusieron en bloques de 4 días, cada uno de ellos perteneciendo a la misma concentración de ETOH y analizados mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, contrastando la variable grupo frente a la concentración de ETOH/tiempo como la variable repetida. Para el tratamiento crónico de AT (días 21-24 y 25-28), los datos fueron analizados también mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas comparando las variables grupo, tratamiento y concentración de ETOH/ tiempo como la variable repetida. Por otro lado, para analizar el efecto de 3NPA (días 25-28), se aplicó un ANOVA de dos vías, utilizando como variables grupo y tratamiento. En cuanto a la ganancia de peso a lo largo del esquema de ingesta de ETOH se analizó con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, grupo (C *vs* Pb) y concentración de ETOH/tiempo como la variable repetida. En todos los casos, cuando se encontró una interacción significativa, se realizó una prueba de Tuckey como prueba *post hoc*, con el resultado de los valores de significancia (*p*) indicados en las leyendas de las figuras.

La actividad de CAT en sangre y en cerebro se analizó mediante de un ANOVA de dos vías: grupo (C *vs* Pb) y edad /ETOH (grupos DPN35, DPN63 y DPN63 ETOH/noETOH). Posteriormente, se aplicó un ANOVA de tres vías: grupo x consumo de ETOH x tratamiento seguido por la prueba de Tuckey. En el caso de la

actividad de CAT cerebral, se comparó con un ANOVA de tres vías con un análisis separado por área.

Por último, la actividad locomotora fue analizada mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas: grupo (C *vs* Pb), consumo de ETOH (ETOH *vs* no ETOH) y tiempo como la variable repetida para el análisis en bloques de 10 min. Las cuentas totales fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías: grupo (C *vs* Pb) y consumo de ETOH (ETOH *vs* no ETOH).

## **Resultados:**

### *Parámetros del modelo de exposición al Pb:*

En la tabla 1, se presentan los parámetros medidos en las madres y sus crías en el modelo de exposición perinatal a Pb. Al respecto, y en concordancia con reportes previos de nuestro laboratorio (Virgolini y cols, 1999), hemos podido reproducir y demostrar que la exposición a 220 ppm de Pb en el agua de bebida durante la gestación y lactancia no induce modificaciones significativas en ninguno de los parámetros medidos. Al respecto, en relación a la ingesta de líquido no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos (C/Pb). Tampoco se observaron cambios en la ganancia de peso de las madres al final de la gestación ni en la duración de la misma. Asimismo, no reportamos alteraciones en el tamaño de las camadas, en la relación macho/hembra ni en la curva de crecimiento de las crías desde el nacimiento hasta el destete, momento en que se interrumpió la exposición al Pb.

### *Niveles de Pb en sangre:*

En la tabla 2 se presentan las plumbemias obtenidas para animales controles y expuestos a Pb a la edad periadolescente y adulta. De acuerdo a lo esperado, los resultados demuestran que los animales controles no presentaron niveles de Pb sanguíneos detectables bajo la metodología usada, es decir que la concentración del metal en sangre fue inferior a 0,75 µg/dl, lo cual podría estar indicando que ni el alimento ni el agua de bebida constituyen una fuente considerable de exposición a Pb para las crías. Por el contrario, los animales de 35 días expuestos a Pb durante la gestación y lactancia presentaron niveles de Pb en sangre de  $6,51 \pm 0,26$  µg/dl, valores

que se encuentran ligeramente por encima del nivel considerado como seguro por los CDC para organismos en desarrollo a partir de la última modificación en los niveles de referencia que se realizó en 2012 que fue de 5 µg/dl.

*Hemoglobinemia:*

En la tabla 2 se presentan los resultados de los niveles de Hb en sangre obtenidos en los grupos experimentales bajo estudio. Puede observarse que las crías de 35 días de edad expuestas a Pb mostraron niveles de Hb significativa pero ligeramente inferiores a sus controles de la misma edad (test de Student  $t=4.44$ ,  $p<0,01$ ). Estos resultados son esperables puesto que como hemos señalado en el marco teórico, aún bajos niveles de Pb tienen la capacidad de reducir la formación del grupo hem, manifestándose este efecto como anemia microcítica e hipocrómica. Sin embargo, la Hb en sangre va incrementándose con la edad, alcanzando a la edad adulta niveles semejantes a los de los controles, por lo que la reducción observada en las crías expuestas a Pb fue revertida, cuando ya el metal no es detectable en sangre.

PERIODO GESTACIONAL		NACIMIENTO		PERIODO POSTNATAL				
DG1	DG22	DPN1	DPN7	DPN14	DPN21	DPN25	DPN35	
←		Exposición al Pb		→				
Madres		Peso de crías machos (g)						
C (9)	Pb (10)	C = 6,53 ± 0,15 (40)						
		Pb = 6,46 ± 0,11(37)						
Ingesta diaria de líquido (ml)		C = 11,43 ± 0,57						
		Pb = 11,05 ± 0,46						
C (25)	Pb (28)	C = 21,58 ± 1,09						
		Pb = 21,32 ± 0,88						
Peso corporal (g) DG1		C = 32,17 ± 2,27					Pb = 30,29 ± 2,05	
228,96 ± 9,34	228,54 ± 11,11							
Peso gamado(g) DG1–GD22		Tamaño de la camada						
		C (40)	Pb (37)					
84,60 ± 4,62	82,68 ± 4,26	Machos 3,81 ± 0,35	3,87 ± 0,36					
Tiempo de gestación (días)		Hembras 5,81 ± 0,41		5,47 ± 0,49				
22,24 ± 0,13	22,35 ± 0,12	Total 9,54 ± 0,54		9,23 ± 0,53				

TABLA 1: Línea del tiempo para el protocolo de exposición al Pb y parámetros del modelo registrados para las madres y sus crías. C= grupo control, Pb= grupo expuesto al Pb. DG= día gestacional; DPN= día postnatal. Datos entre paréntesis indican el número de animales por gr

	DPN35	DPN63
Niveles de Pb en sangre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	C < 0,75 (6)	< 0,75 (5)
	Pb 6,51 + 0,26* (5)	< 0,75 (1) <1,80 (5)
Niveles de Hemoglobina (g/dl)	C 14,6 + 0,9 (8)	18,4 + 0,6 (5)
	Pb 11,0 + 0,4* (8)	20,8 + 0,5 (5)

TABLA 2: Determinaciones bioquímicas registradas en el modelo de exposición. C= grupo control; Pb= grupo expuesto al Pb. Niveles de Pb en sangre  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (arriba) límite de detección=0,75  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; límite de cuantificación=1,80  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Niveles de hemoglobina en g/dl. \*( $t=4,44$ ,  $p<0,01$ ). Entre paréntesis se indica el número de animales de cada grupo. \* Denota diferencia en relación a su respectivo control de la misma edad a  $p<0,01$ .

### *Consumo voluntario de Etanol en respuesta a AT:*

Los datos graficados en las figuras 11A) y 11B) corresponden al consumo voluntario de ETOH de animales C y perinatalmente expuestos al Pb durante los 28 días de duración del experimento. A los fines de facilitar su análisis y su observación, se han compactado los días en los que la concentración de ETOH permaneció constante en bloques de 4 días (indicado por rectángulos con flechas), incluyendo los últimos 8 días en los que los animales fueron inyectados con SAL o con AT, (últimos 4 días en el caso de 3NPA). Por otra parte, se ha discontinuado el eje horizontal del gráfico para enfatizar el momento en el que se comenzó a administrar los moduladores de CAT: AT o 3NPA. Así, en la figura 11A) está representado el consumo de ETOH expresado como g de ETOH consumido por Kg de peso corporal mientras que la figura 11B) muestra la preferencia de ETOH sobre  $\text{H}_2\text{O}$ , en ambos casos en función de los días agrupados por concentración de ETOH. Además, en la parte superior de ambos gráficos se ha esquematizado la vía de metabolización del ETOH en condiciones fisiológicas (izquierda), mientras que indicado por una flecha cuando se ha inducido el bloqueo farmacológico de la enzima CAT (derecha) o cuando la CAT fue activada, coincidiendo

especialmente ambas condiciones con la curva de consumo de ETOH (tomada de Quertemont y Didone, 2006).

Consumo basal: de la observación de la figura 11A) puede evidenciarse que a concentraciones de ETOH del 6% y hasta el 10% (día 20 del esquema), se evidencia un mayor consumo voluntario de ETOH, selectivamente en los animales expuestos a Pb (panel izquierdo), manifestándose como una diferencia estadística entre los grupos C y Pb, lo que contrasta con el bajo consumo de los animales C durante todo el esquema. Así, los datos obtenidos por la prueba de ANOVA para muestras repetidas indican un efecto significativo del factor tratamiento perinatal, grupo (C vs Pb):  $F(1,156)=33,21$ ;  $p<0,001$  así como de la variable repetida (tiempo/concentración de ETOH):  $F(4,156)=4,93$ ;  $p<0,001$ , y de la interacción entre ambos:  $F(4,156)=2,45$ ;  $p<0,05$ .

En la figura 11B) se representa la relación de preferencia entre las soluciones de ETOH y H<sub>2</sub>O durante los días 1-20 de la prueba de libre elección de ETOH. De acuerdo a lo esperado, la preferencia por la droga disminuyó a medida que aumentó la concentración de ETOH, cayendo a 10-20% cuando las concentraciones de ETOH fueron elevadas al 10%. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló diferencias significativas en el grupo:  $F(1,156)=9,94$ ;  $p<0,01$ , y en la variable repetida:  $F(4,156)=11,08$ ;  $p<0,001$ .

Con respecto al efecto que produce la ingesta de ETOH sobre el incremento de peso, podemos observar que los resultados demostraron que, si bien en ambos grupos se produjo el aumento normal con el tiempo, el consumo voluntario de ETOH disminuyó la pendiente de este aumento:  $F(1,144)=17,90$ ;  $p<0,001$ ) como puede observarse en la figura 12.

Administración de AT: el consumo elevado de ETOH observado diferencialmente en los animales expuestos perinatalmente a Pb pudo ser revertido con el pretratamiento de 250 mg/kg de AT, agente bloqueante de la enzima CAT, administrado 5 h antes del consumo durante los últimos 8 días del test (días 21-28; panel derecho). Los resultados del ANOVA para medidas repetidas (días 21-24 y 25-28) revelaron un efecto significativo de la variable grupo (C vs Pb):  $F(1,37)=27,80$ ;  $p<0,001$ , tratamiento (SAL, AT):  $F(1,37)=4,28$ ;  $p<0,05$ , de la interacción entre ambas:  $F(1,37)=6,74$ ;  $p<0,02$  y en forma marginal para la interacción entre la variable repetida tiempo/tratamiento y grupo:  $F(1,37)=4,10$ ;  $p=0,0502$ . De la misma manera, el pretratamiento con AT fue capaz de disminuir la preferencia al ETOH diferencialmente en las ratas expuestas al Pb (figura 10B). El análisis estadístico reveló un efecto significativo de grupo (C vs Pb):

F(1,37)=6,27;  $p < 0,02$ , una diferencia casi significativa de tratamiento (SAL, AT):  
 F(1,37)=4,09;  $p = 0,05$ , una interacción significativa entre el grupo y tratamiento:  
 F(1,37)=15,48;  $p < 0,001$ , así como en la interacción entre el grupo y la variable repetida:  
 F(1,37)=4,59;  $p < 0,05$ .

La ingesta de Etoh (g/kg) en los días 17-20 fue de: C-SAL=1,13±0,29; C-AT=1,10±0,17; Pb-SAL=1.87±0.26; Pb-AT=2,12±0,32.

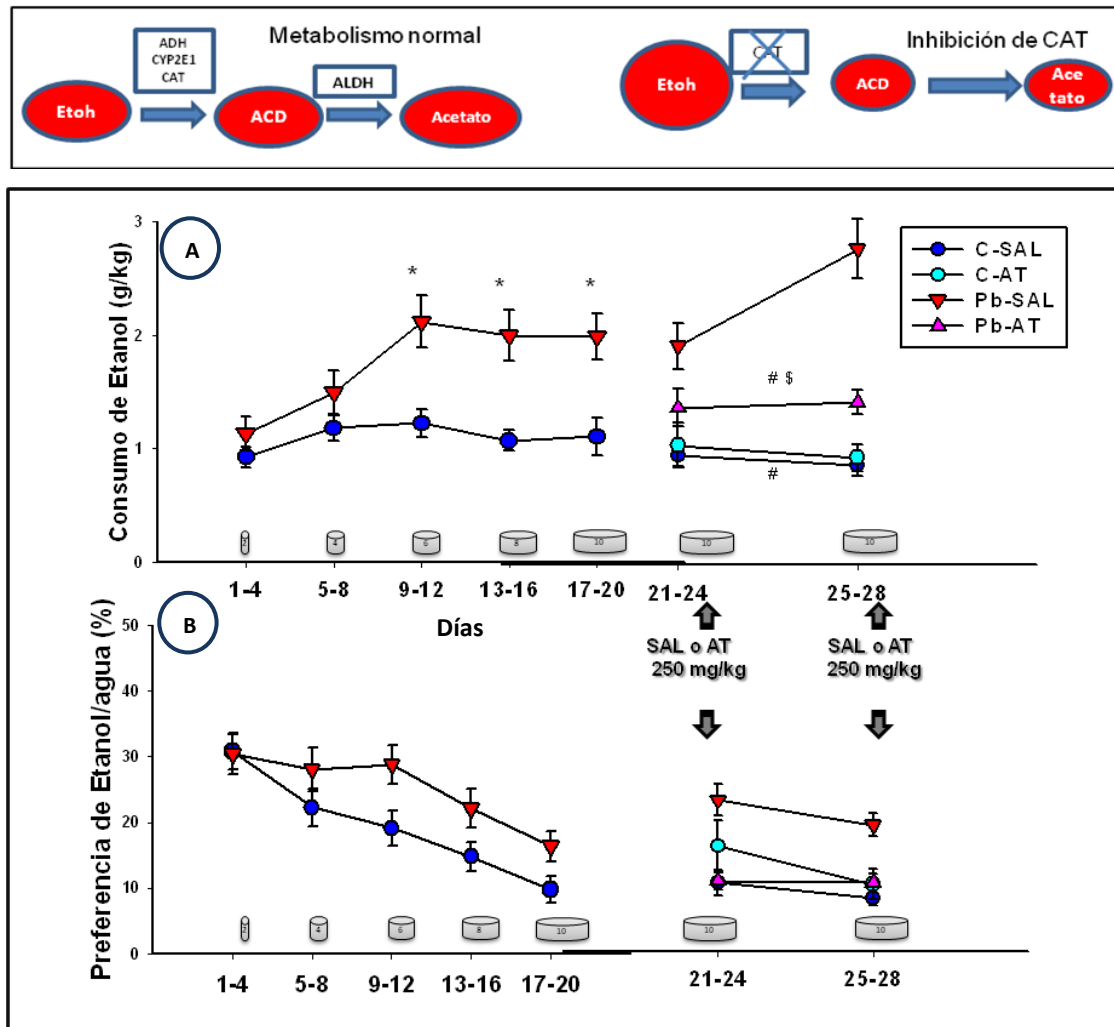


Figura 11: Esquema de consumo voluntario de ETOH en respuesta a la administración de AT. En la parte superior se representa el metabolismo de ETOH en condiciones fisiológicas (izquierda) y luego del bloqueo farmacológico de la enzima (derecha) (tomado de Quertemont y Didone, 2006). A) Consumo de etanol expresado como g de etanol/kg de peso corporal. B) Relación de preferencia etanol/agua. Los datos (media + ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal. Las concentraciones de ETOH fueron simbolizadas como cilindros (días 1-4: concentración de ETOH al 2%; días 5-8: concentración de ETOH al 4%; 9-12: concentración de ETOH al 6%; 13-16 días: concentración de ETOH al 8%, y días 17-20: concentración de ETOH al 10%). Las flechas representan la administración

de SAL o AT (días 21-24 y 25-28; 0,25 mg/kg i.p.). \*indica  $p= 0,0001$  en comparación con los respectivos C. Administración de AT: # significa diferencia significativa a  $p<0,0001$  en relación a los animales inyectados con SAL del mismo grupo; \$ Diferente entre los animales C con los animales inyectados con AT en  $p<0,02$ .

C-SAL=10; C-AT=11; Pb-SAL=11; Pb-AT=9 animales por grupo.

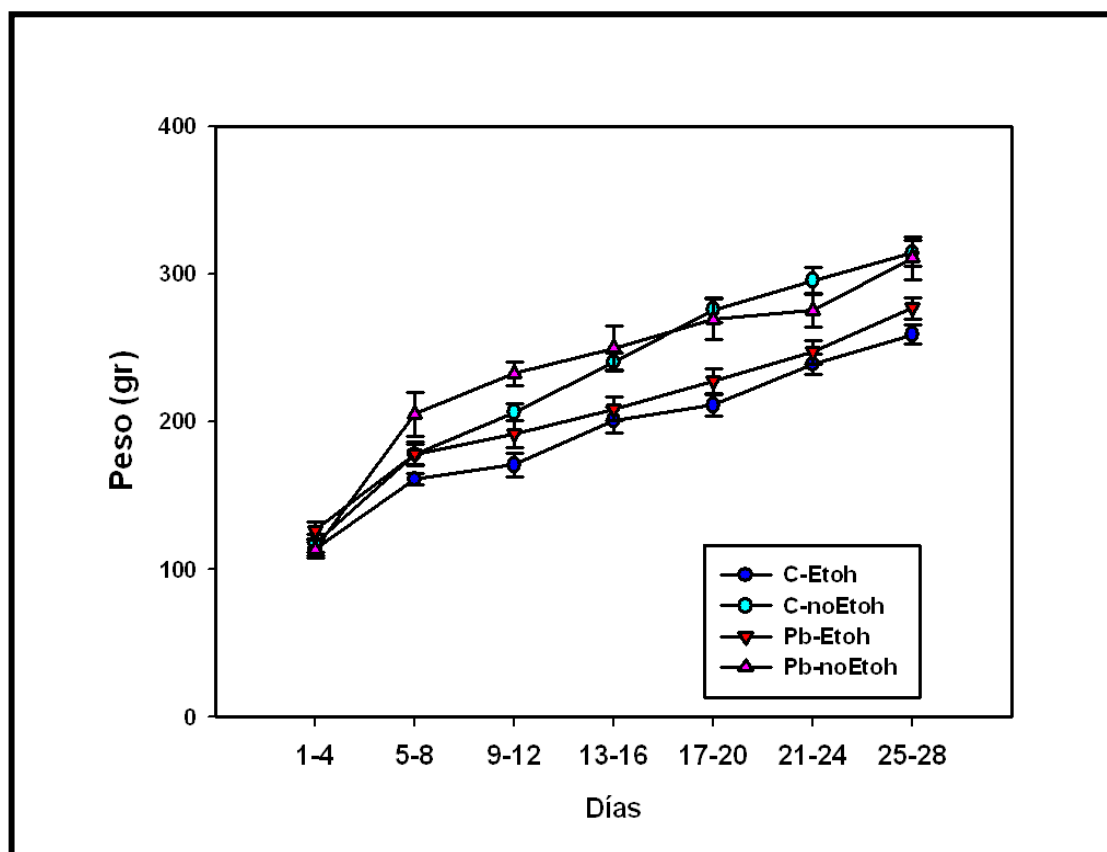


Figura 12: Pesos de los animales sometidos al esquema de consumo voluntario y sus respectivos grupos controles noETOH. El número de animales para cada grupo fue de: C-ETOH=12, Pb-ETOH=14, C-noETOH=8, Pb-noETOH=8.

### *Consumo voluntario de Etanol en respuesta a 3NPA:*

Consumo basal: la figura 13 (izquierda) representa el consumo voluntario de ETOH en condiciones basales (días 1-20). Tal como se demostró previamente se evidencia un aumento de la ingesta de ETOH en los animales expuestos perinatalmente a bajas dosis de Pb, en este caso a partir de la concentración del 2%, mientras que los animales C muestran desde el inicio un consumo relativamente bajo, que se mantiene estable durante todo el experimento. Puede observarse que el análisis estadístico reveló un

efecto significativo de grupo:  $F(1,175)=111,50$ ;  $p<0,0001$ , la variable repetida:  $F(5,175)=7,22$ ;  $p<0,0001$ , y su interacción:  $F(5,175)=2,57$ ;  $p<0,05$ . En el caso de los datos de preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, el ANOVA de dos vías de medidas repetidas revela un efecto significativo del grupo:  $F(1,175)=99,88$ ;  $p<0,0001$  y la variable repetida:  $F(5,175)=6,52$ ;  $p<0,0001$ .

Administración 3NPA: en la figura 13 A) (derecha), puede observarse el efecto de la administración durante 4 días de 3NPA en el consumo voluntario de ETOH. Es importante aclarar que al finalizar el experimento ningún animal manifestó indicios de toxicidad evidente, lo cual constituye un dato relevante debido a la toxicidad que genera en los animales la utilización de esta droga. En el día 20 del esquema de consumo voluntario, se registró durante 4 días adicionales la ingesta total de líquidos, y posteriormente se procedió a la administración de 3NPA en los 4 días finales del esquema (días 25-28). La dosis de 20 mg/kg fue la seleccionada, ya que a esta dosis observamos la mayor ingesta de ETOH, asociada con un incremento de la actividad de CAT y con la menor citotoxicidad a nivel estriatal (como se detallará más adelante). Los datos analizados, demuestran que el 3NPA fue capaz de incrementar el consumo de ETOH no sólo en los animales que estuvieron expuestos al Pb sino también en el grupo C en comparación con los animales inyectados con SAL. El análisis estadístico del ANOVA de dos vías de medidas repetidas, refleja un efecto significativo de grupo:  $F(1,33)=9,97$ ;  $p<0,01$  y drogas:  $F(1,33)=14,43$ ;  $p<0,001$ . Se observó un efecto similar en cuanto al análisis de la preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, mostrando principalmente una mayor preferencia de ETOH en el grupo expuesto al Pb con una diferencia significativa en la variable grupo:  $F(1,33)=6,88$ ;  $p<0,02$ , y en el tratamiento con la droga:  $F(1,33)=7,90$ ;  $p<0,01$ .

La ingesta de Etoh (g/kg) en los días 21-24 fue de: C-SAL =  $0,53 \pm 0,08$ ; C-3NPA =  $0,55 \pm 0,10$ ; Pb-SAL =  $1,49 \pm 0,15$ ; Pb-3NPA =  $1,40 \pm 0,11$ .



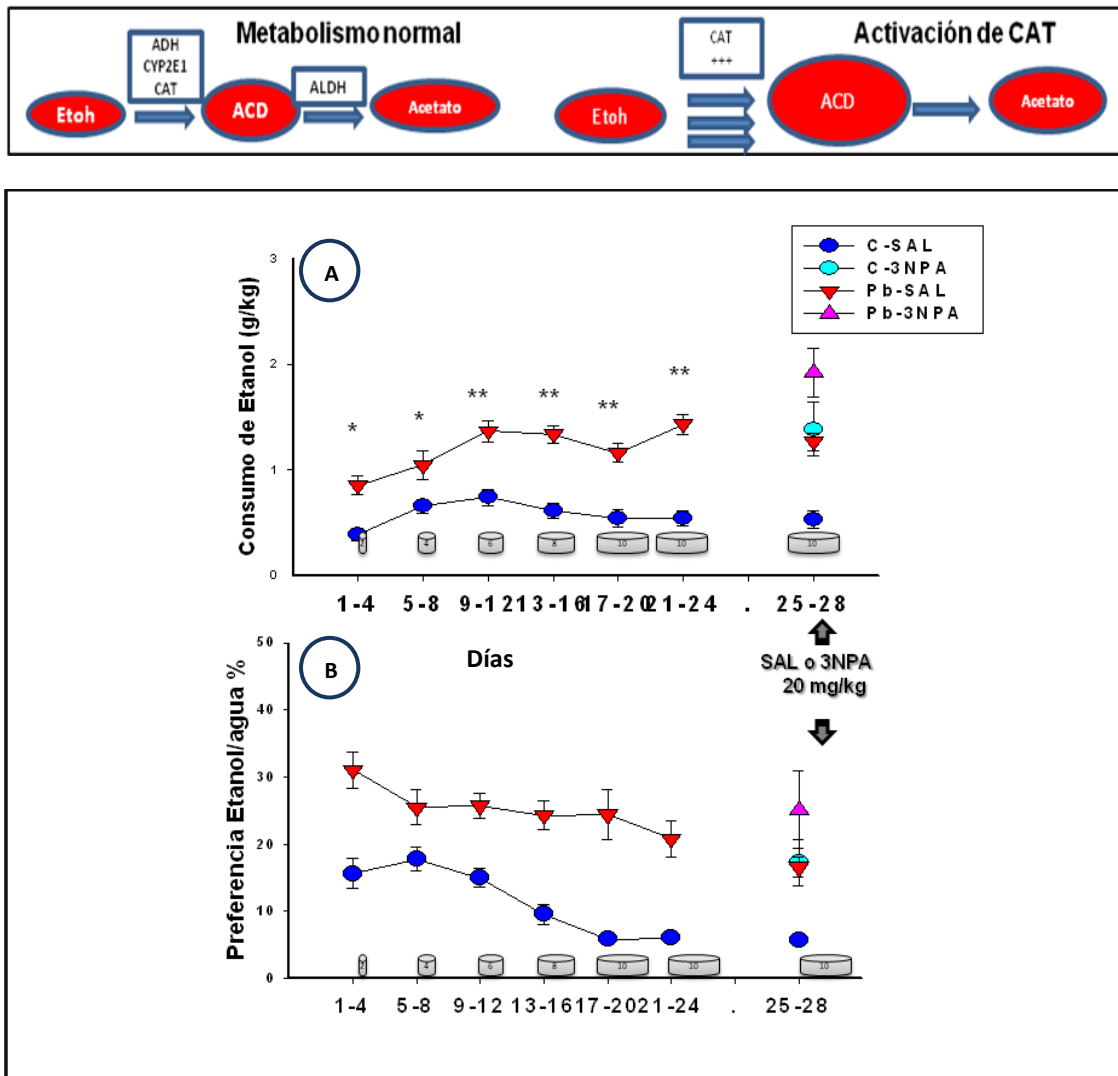


Figura 13: Consumo voluntario de ETOH en respuesta a la administración de 3NPA (durante 4 días: 25-28). En la parte superior se representa el metabolismo normal del ETOH (izquierda) y después de la administración del activador de la actividad enzimática de CAT (derecha) (tomado de Quertemont y Didone, 2006). A) Consumo de ETOH expresado como g de ETOH/kg de peso corporal. B) Preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media + ES) fueron agrupados, de igual manera que con el AT en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, correspondiendo cada bloque a la misma concentración de ETOH, la cual (como se indicó) fue incrementándose cada 4 días (días 1-4: concentración de ETOH al 2%; días 5-8: concentración de ETOH al 4%; 9-12: concentración de ETOH al 6%; 13-16 días: concentración de ETOH al 8%, y días 17-20: concentración de ETOH al 10%). La flecha representa el inicio de la administración de SAL o 3NPA (días 25-28; 20 mg/kg s.c.). \*indica  $p < 0,002$ , y \*\* $p < 0,0001$  en comparación con el grupo C. C-SAL=8; C-3NPA=11; Pb-SAL=9; Pb-3NPA=9 animales por grupo.

*Curva dosis/respuesta de 3NPA:*

Administración crónica de 3NPA a una dosis de 10 mg/kg: con el objeto de realizar una curva dosis-respuesta de 3NPA en el consumo de ETOH, se administró 3NPA en una dosis de 10 mg/kg una vez que el mismo se estabilizó durante los últimos 4 días (25-28). En este caso, al igual que en los experimentos anteriores, la sola exposición a Pb fue capaz de incrementar el consumo de ETOH, como puede evidenciarse en el análisis estadístico del ANOVA de medidas repetidas de dos vías, que reveló un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,125)=102,38$ ;  $p<0,0001$ , la variable repetida:  $F(5,125)=6,78$ ;  $p<0,0001$ , y su interacción:  $F(5,125)=3,73$ ;  $p<0,01$  como puede observarse en la figura 13. La preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O durante el inicio del estudio reveló resultados similares. En efecto, el ANOVA de medidas repetidas de dos vías reveló un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,125)=123,97$ ;  $p<0,0001$ , la variable repetida:  $F(5,125)=8,76$ ;  $p<0,0001$ , aunque la interacción entre ambos no fue significativa. Sin embargo, la administración crónica de esta dosis de 3NPA no fue suficiente para incrementar el consumo de ETOH o la preferencia en ambos grupos en comparación con los animales inyectados con SAL. Por lo tanto, el análisis del ANOVA, sólo reveló un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,23)=17,62$ ;  $p<0,001$ . Del mismo modo, el análisis de la preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O demostró un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,23)=5,82$ ;  $p<0,05$  y tratamiento:  $F(1,23)=5,09$ ;  $p<0,05$ , pero no se observó una interacción significativa entre ellos (figura 14).

Administración crónica de 3NPA a una dosis de 30 mg/kg: la dosis de 3NPA 30 mg/kg fue administrada siguiendo el procedimiento ya descrito para las otras dos dosis, es decir durante los últimos 4 días del consumo, una vez que éste se mantuvo estabilizado. Tal como puede observarse en la figura 15, el consumo de ETOH basal fue mayor en el grupo expuesto a Pb en comparación con los animales C, reproduciendo nuevamente los datos obtenidos en los experimentos anteriores. Según lo revelado por el análisis del ANOVA de dos vías de medidas repetidas, hubo un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,185)=102,89$ ;  $p<0,0001$ , la variable repetida:  $F(5,185)=10,37$ ;  $p<0,0001$ , y su interacción:  $F(5,185)=3,76$ ;  $p<0,01$ . Se obtuvieron efectos similares cuando se analizó la preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, el análisis del ANOVA de medidas repetidas evidenció un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,185)=75,39$ ;  $p<0,0001$ , la variable repetida:  $F(5,185)=16,00$ ;  $p<0,0001$ , con una interacción entre ambas no significativa. Este efecto se potenció cuando se procedió a administrar 3NPA y se observó, de manera sorpresiva

nuevamente no sólo en los animales expuestos a Pb, sino también en los C en comparación con los animales inyectados con SAL. En efecto, el análisis del ANOVA reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,35)=27,72$ ;  $p<0,0001$ , tratamiento:  $F(1,35)=33,69$ ;  $p<0,0001$ , con una interacción no significativa entre ellos.

Por lo tanto, y a pesar de que la administración crónica de 30 mg/kg de 3NPA fue capaz de incrementar el consumo de ETOH en ambos grupos, se seleccionó la dosis de 20 mg/kg, con la cual se obtuvo el mismo efecto pero acompañado de un menor daño a nivel del estriado, teniendo en cuenta las propiedades neurotóxicas de 3NPA resultado que fue analizado a través de la tinción de Nissl, como se explicará a continuación.

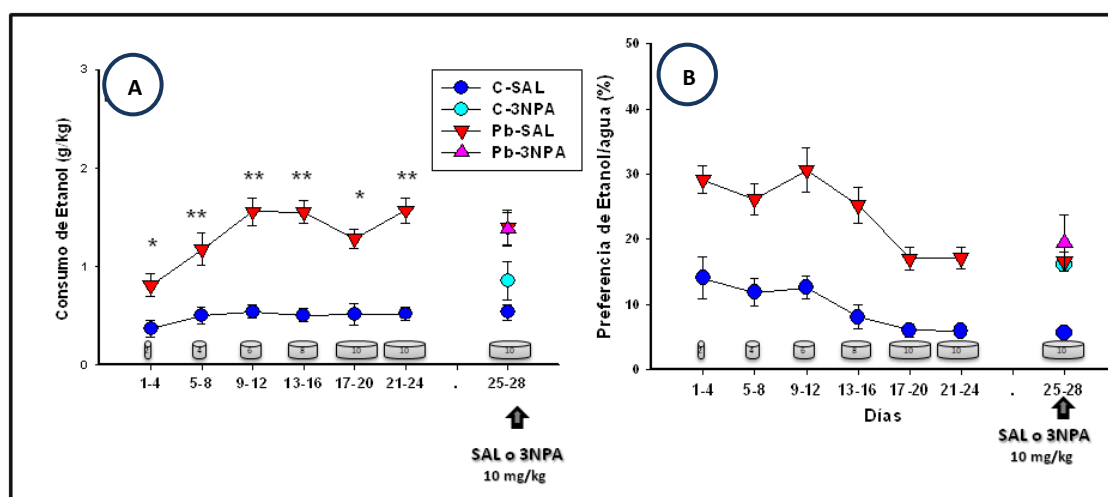


Figura 14: Consumo voluntario de ETOH en respuesta a la administración de 3NPA (10 mg/kg s.c. durante 4 días). A) El consumo de ETOH se expresó como g de ETOH/kg de peso corporal. B) Preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media + ES) fueron agrupados en bloques de 4 días correspondientes a la misma concentración y de manera creciente de ETOH (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; 13-16 días: 8%, y los días 17 a 20 y de 21 a 24: 10%). La flecha significa la administración de SAL o 3NPA (día 25-28; 10 mg/kg): \* indica  $p<0,01$ , y \*\* $p<0,0001$  en comparación con el grupo C. C-SAL = 8; C-3NPA = 5, Pb-SAL = 9, Pb-3NPA = 5 animales por grupo.

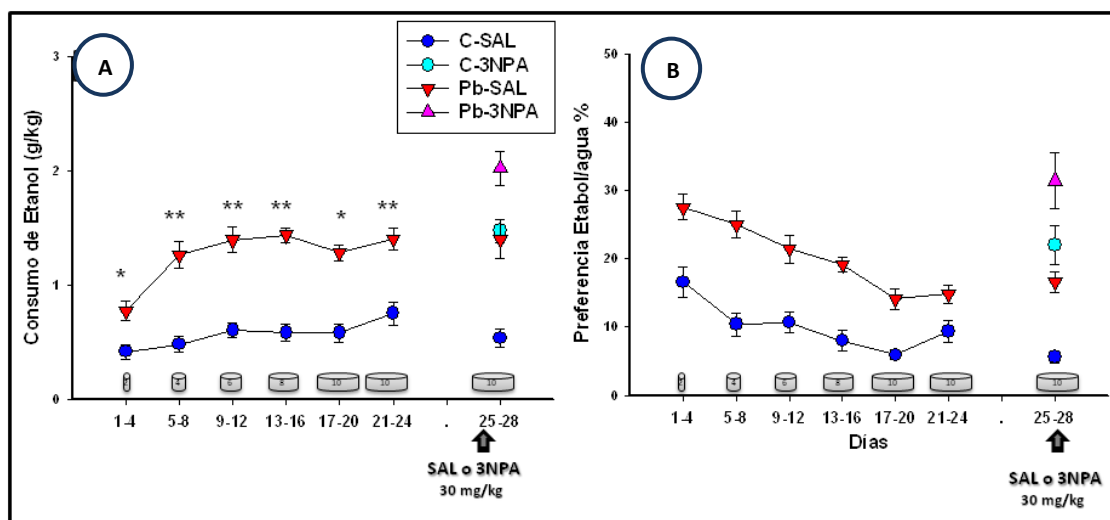


Figura 15: Consumo voluntario de etanol en respuesta a la administración 3NPA (30 mg / kg s.c durante 4 días). A) El consumo de ETOH se expresó como g de ETOH/kg de peso corporal B) Preferencia de ETOH/ agua. Los datos (media + ES) fueron agrupados en bloques de 4 días correspondiente cada bloque a la misma concentración de ETOH, a concentraciones crecientes del mismo (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; 13-16 días: 8%, y los días 17 a 20 y de 21 a 24: 10%). La flecha significa la administración de SAL o 3NPA (día 25-28; 10 mg / kg. \* indica  $p < 0,01$ , y \*\*  $p < 0,0001$  en comparación con el grupo C. C-SAL = 8; C-3NPA = 11, Pb-SAL = 9, Pb-3NPA = 11 animales por grupo.

### Consumo de sacarosa:

Los resultados demuestran que todos los animales mostraron una clara preferencia por sacarosa y no se observaron diferencias entre los grupos C y Pb durante los primeros 4 días del esquema, como puede observarse en la figura 16. La administración de SAL durante los días 5-12, no fue capaz de modificar la ingesta de sacarosa, aunque puede observarse (tal como lo revela el análisis estadístico del ANOVA de dos vías de medidas repetidas) un ligero aumento en la preferencia en ambos grupos,  $F(1,4)=10,47$ ;  $p < 0,05$ . La administración de AT, no produjo una disminución de la preferencia por la solución palatable; por el contrario, tanto los C como los animales expuestos a Pb mostraron un pequeño aumento en la ingesta de sacarosa en el tiempo:  $F(2,6)=13,55$ ;  $p < 0,01$ , de manera similar a los animales administrados con SAL.

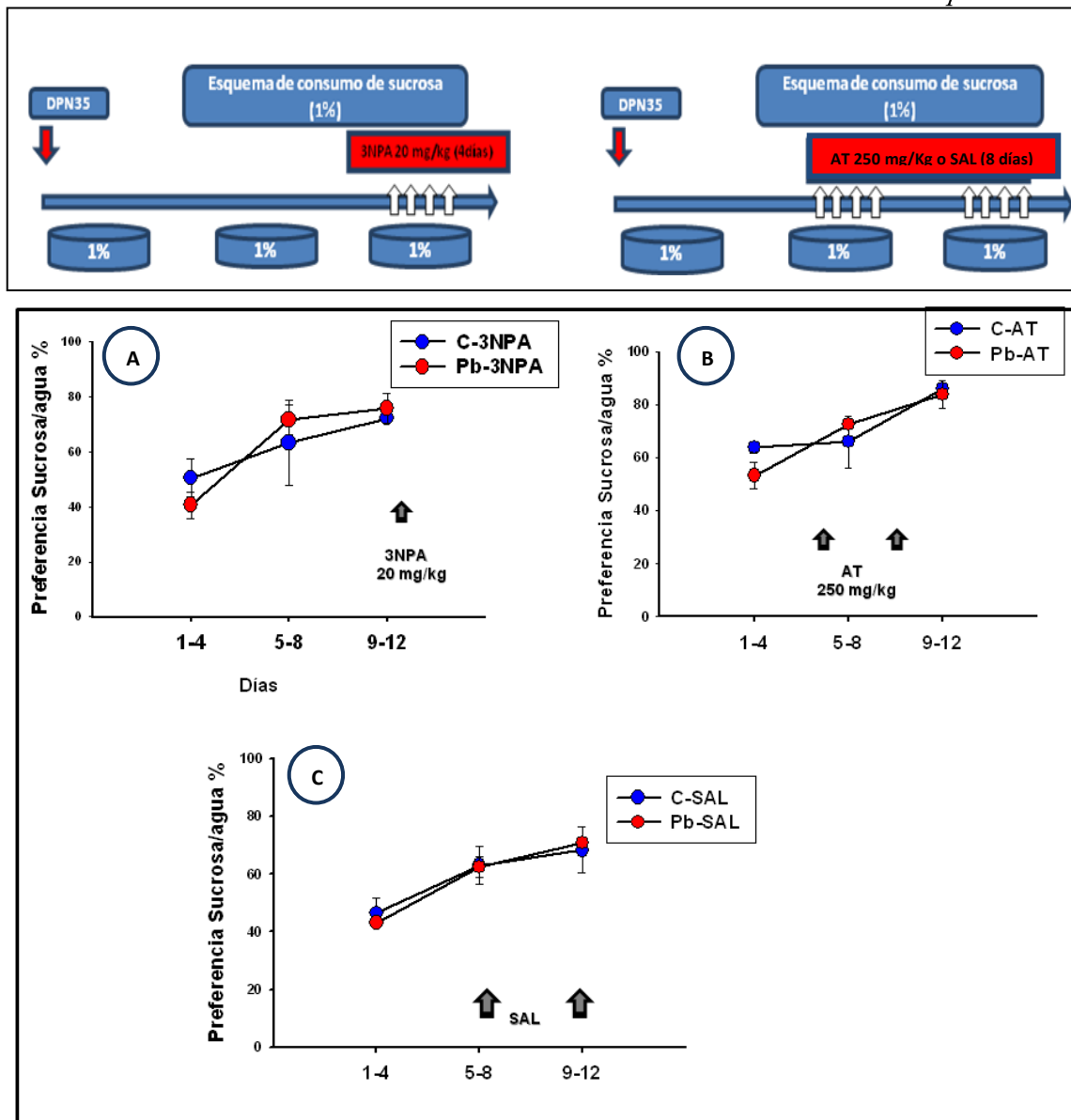


Figura 16: Consumo voluntario de sacarosa en ratas tratadas con SAL, 3NPA o AT. Los datos (media + ES) se agruparon en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal. La ingesta de sacarosa se representó como el porcentaje de preferencia de sacarosa sobre el H<sub>2</sub>O. Las flechas simbolizan el inicio de la administración de SAL, AT o 3NPA. A) Consumo de sacarosa basal (días 1-4), y después de la administración SAL (días 5-12). C-SAL= 2; Pb-SAL= 2 animales por grupo. B) Consumo de sacarosa basal sin tratamiento (días 1-4), y después de la administración de AT (días 5-12; 250 mg /kg i.p.). C-AT= 2, Pb-AT= 3 animales por grupo. C) Consumo de sacarosa basal (días 1-8), y después de la administración 3NPA (días 9-12; 20 mg/kg s.c.). C-3NPA=2, Pb-3NPA=3 animales por grupo.

*Actividad locomotora:*

En la figura 17 puede observarse en el panel derecho el total de cuentas durante los 60 min de la prueba, tanto de los grupos sometidos al esquema de consumo voluntario como sus contrapartes controles noETOH. En la parte inferior se han graficado los datos de las cuentas cada 10 min a lo largo de los 60 min de la prueba. El

empleo de un ANOVA de medidas repetidas reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,47)=11,24$ ;  $p<0,002$ , tiempo:  $F(5,235)=82,61$ ;  $p<0,001$ , grupo x consumo de ETOH:  $F(1,47)=9,745$ ,  $p<0,005$ , tiempo x consumo de ETOH:  $F(5,235)=6,36$ ;  $p<0,001$ , y la interacción global entre grupo x consumo de ETOH x tiempo  $F(5,235)=3,45$ ;  $p<0,01$ . Además, del análisis del ANOVA realizado para analizar los recuentos totales de la actividad locomotora reveló una interacción significativa entre grupo y consumo de ETOH  $F(3,47)=7,22$ ;  $p<0,001$ , lo que evidencia que la hiperlocomoción que se observa después del esquema de consumo voluntario es observada preferencialmente en los animales expuestos a Pb.

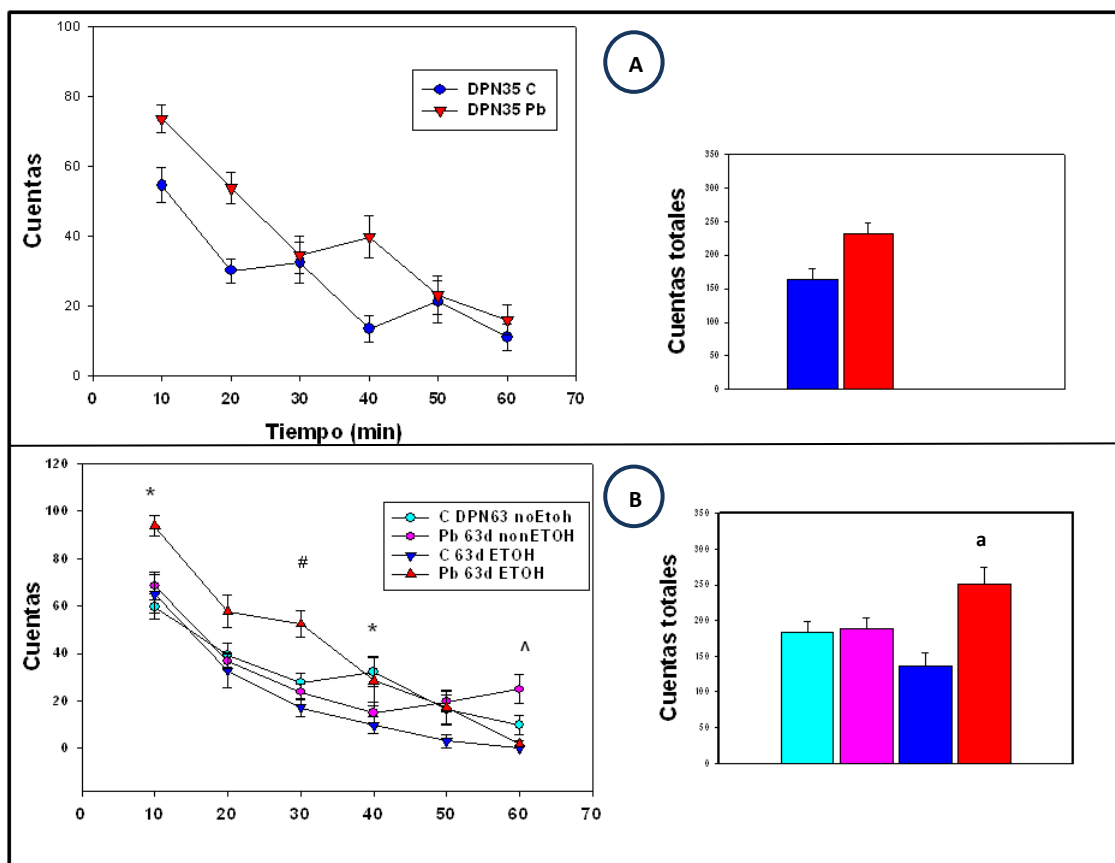


Figura 17: Efecto del consumo voluntario de ETOH en la actividad locomotora. El gráfico representa los datos tanto de A) animales sometidos al paradigma de libre elección de ETOH/H<sub>2</sub>O y B) sus contrapartes no-ETOH. \* Denota  $p<0,05$  en comparación con todos los grupos al mismo tiempo; # Indica  $p<0,05$  en relación con los animales C en el mismo tiempo que consumieron ETOH; y ^ denota  $p<0,05$  entre el grupo Pb DPN63 ETOH y los animales expuestos a Pb DPN63 noETOH. La letra "a" denota significativamente diferente de todos los otros grupos  $p<0,02$ . C DPN63d ETOH = 11; C DPN63 noETOH = 14; Pb DPN63 ETOH = 12; Pb DPN63 noETOH = 14 animales por grupo.

*Alcoholemia:*

Los resultados demuestran, que los niveles de ETOH en sangre obtenidos en el grupo de animales controles inyectados con SAL fueron similares a los de las ratas expuestas a Pb, lo cual indicaría que no existen cambios significativos en la farmacocinética de la droga en sangre y permitiría presuponer que las diferencias en la ingesta de ETOH podrían deberse a los efectos reforzantes del ETOH (o ACD) en cerebro. Los resultados del ANOVA sólo demuestran una diferencia significativa en la variable droga (SAL *vs* AT *vs* 3NP):  $F(1,33)=10,60$   $p<0,01$ .

Los valores obtenidos de concentración de ETOH en sangre (BACs) en mg/dl con límite de cuantificación=1,0 mg/dl fueron: C DPN63 ETOH-SAL=  $4,1\pm 3,2$  (9), C DPN63 ETOH-AT=  $55,0\pm 11,8$  (9), C DPN63 ETOH-3NPA=  $4,3(1)$  y  $<1,0$  (3) y Pb DPN63 ETOH-SAL=  $8,0\pm 4,9$  (9), Pb DPN63 ETOH-AT=  $44\pm 21,6$  (10), Pb DPN63 ETOH-3NPA=  $<1,0$  (4).

*Actividad de CAT:*

En la tabla 3, se expresa la actividad enzimática de CAT, tanto en sangre como en las distintas áreas cerebrales en los grupos C y los animales expuestos perinatalmente a Pb en el DPN35 y para los animales que fueron expuestos al paradigma de libre elección de ETOH y fueron inyectados con SAL, AT o 3NPA (20 mg/Kg) así como aquellos que no consumieron ETOH.

*Actividad enzimática de CAT en sangre:*

La actividad enzimática de CAT se comparó, en primer lugar en los dos grupos etarios diferentes en la condición noETOH (grupo DPN35 *vs*. Grupo DPN63 noETOH-SAL). Se empleó como análisis estadístico un ANOVA de dos vías, el cual evidenció un efecto significativo del grupo:  $F(1,22)=13,84$ ;  $p<0,01$ , edad:  $F(1,22)=17,92$ ;  $p<0,001$ , y su interacción:  $F(1, 22)=16,96$ ;  $p<0,001$ .

Por otra parte, se realizó de manera separada un ANOVA de dos vías para comparar la actividad de CAT en sangre en el grupo DPN35 con animales adultos que fueron expuestos al consumo de ETOH DPN63 ETOH (grupo DPN35 *vs* grupo DPN63 ETOH-SAL), revelando un efecto significativo del grupo:  $F(1,27)=52,40$ ;  $p<0,0001$ , la ingesta de ETOH/edad:  $F(1,27)=10,77$ ;  $p<0,01$ , y su interacción:  $F(1,27)=12,00$ ;  $p<0,01$ . Finalmente, se compararon mediante un ANOVA de tres vías los grupos

de animales adultos. Este análisis mostró un efecto significativo de grupo:  $F(1,43)=11,70$ ,  $p<0,01$ , fármaco:  $F(2,43)=13,09$ ;  $p<0,0001$ , ingesta de ETOH:  $F(1,43)=10,22$ ;  $p<0,01$ , grupo x tratamiento:  $F(2,43)=9,72$ ;  $p<0,001$ , grupo x ETOH:  $F(1,43)=10,99$ ;  $p<0,001$ , tratamiento x ETOH:  $F(1,43)=10,86$ ;  $p<0,001$  y la interacción entre los tres factores:  $F(2,43)=11,27$ ;  $p<0,0001$ .

*Actividad de CAT en sangre: experimentos piloto para determinar la dosis y el tiempo de administración de 3NPA:*

Se realizó un análisis de ANOVA de tres vías separadas para los grupos administrados con las dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg. Las figuras 18 y 19 (izquierda), representan la actividad enzimática de CAT en sangre, tanto de los animales C como de los animales expuestos al Pb que han sido inyectados con las dosis de 10 y 30 mg/kg de 3NPA, que han estado expuestos al paradigma de consumo voluntario así como sus respectivos grupos no ETOH.

Los datos indican que la dosis de 10 mg/kg de 3NPA no fue capaz de provocar un incremento significativo de la actividad enzimática de CAT en ningún grupo de animales (figura 18 izquierda). Los resultados del ANOVA de tres vías apoyan estas afirmaciones que conducen a un efecto significativo de grupo:  $F(1,37)=14,88$ ;  $p<0,001$ , de tratamiento:  $F(1,37)=19,72$ ;  $p<0,0001$ , ingesta de ETOH:  $F(1,37)=19,09$ ;  $p<0,0001$ , tratamiento x grupo:  $F(1,37)=15,05$ ;  $p<0,001$ , grupo x ETOH:  $F(1,37)=16,12$ ;  $p<0,001$ , tratamiento x ETOH:  $F(1,37)=11,99$ ;  $p<0,01$ , y la interacción entre los tres factores:  $F(1,37)=16,05$ ;  $p<0,001$ .

Del mismo modo, la administración crónica de 3NPA a la dosis de 30 mg/kg no modificó la actividad enzimática de CAT en sangre en ninguno de los grupos, tal como puede evidenciarse en la figura 19 (izquierda) aunque se observó un aumento en los grupos de animales que no estuvieron sometidos a la ingesta voluntaria de ETOH (figura 16B). El análisis del ANOVA de tres vías mostró un efecto significativo de grupo:  $F(1,41)=14,70$ ;  $p<0,001$ , de tratamiento:  $F(1,41)=14,17$ ;  $p<0,001$ , ETOH:  $F(1,41)=10,27$ ;  $p<0,01$ , grupo x tratamiento:  $F(1,41)=15,65$ ;  $p<0,001$ , grupo x ETOH:  $F(1,41)=17,19$ ;  $p<0,001$ , tratamiento x ETOH:  $F(1,41)=21,89$ ;  $p<0,0001$ , y la interacción global entre los tres factores:  $F(1,41)=15,43$ ;  $p<0,001$ .



*Actividad de CAT cerebral: Experimentos piloto para determinar la dosis y el tiempo de administración de 3NPA:*

La figura 18 (derecha) representa la actividad enzimática cerebral de CAT analizada en los animales inyectados con la dosis de 10 mg/kg de 3NPA para los grupos ETOH y noETOH respectivamente. El ANOVA de tres vías, que fue realizado por separado para cada área del cerebro reveló un efecto significativo de la interacción de tratamiento x ETOH:  $p < 0,05$  en el cerebelo, la corteza frontal y el núcleo accumbens. El análisis del hipocampo reveló un efecto significativo en la variable tratamiento:  $F(1,44)=9,44$ ;  $p < 0,01$ , ETOH:  $F(1,44)=14,57$ ;  $p < 0,001$ , en la interacción de grupo x ETOH:  $F(1,44)=13,41$ ;  $p < 0,001$ , y en la interacción grupo x tratamiento x ETOH  $F(1,44)=8,05$ ;  $p < 0,01$ . Del mismo modo, el análisis del hipotálamo presentó un efecto significativo en la variable tratamiento:  $F(1,44)=57,04$ ;  $p < 0,0001$ , ETOH:  $F(1,44)=10,08$ ;  $p < 0,01$ , en la interacción grupo x ETOH:  $F(1,44)=13,41$ ;  $p < 0,001$ , y en la interacción general grupo x tratamiento x ETOH  $F(1,44)=8,24$ ;  $p < 0,01$ .

Los resultados obtenidos para los animales ETOH y noETOH inyectados con la dosis de 30 mg/kg de 3NPA, pueden observarse en las figuras 19 (derecha). El análisis del ANOVA de tres vías realizado para cada área del cerebro por separado reveló una diferencia significativa en la interacción ETOH x edad para el cerebelo, la corteza frontal, el hipotálamo, y el núcleo accumbens  $p < 0,01$ , mientras que el análisis de los datos de hipocampo manifestó un efecto significativo en la variable tratamiento:  $F(1,51)= 46,76$ ;  $p < 0,0001$ , ETOH:  $F(1,51)=4,11$ ;  $p < 0,05$ , en la interacción grupo x ETOH:  $F(1,51)=13,76$ ;  $p < 0,001$ , y en la interacción general grupo x tratamiento x ETOH  $F(1,51)=13,94$ ;  $p < 0,001$ .

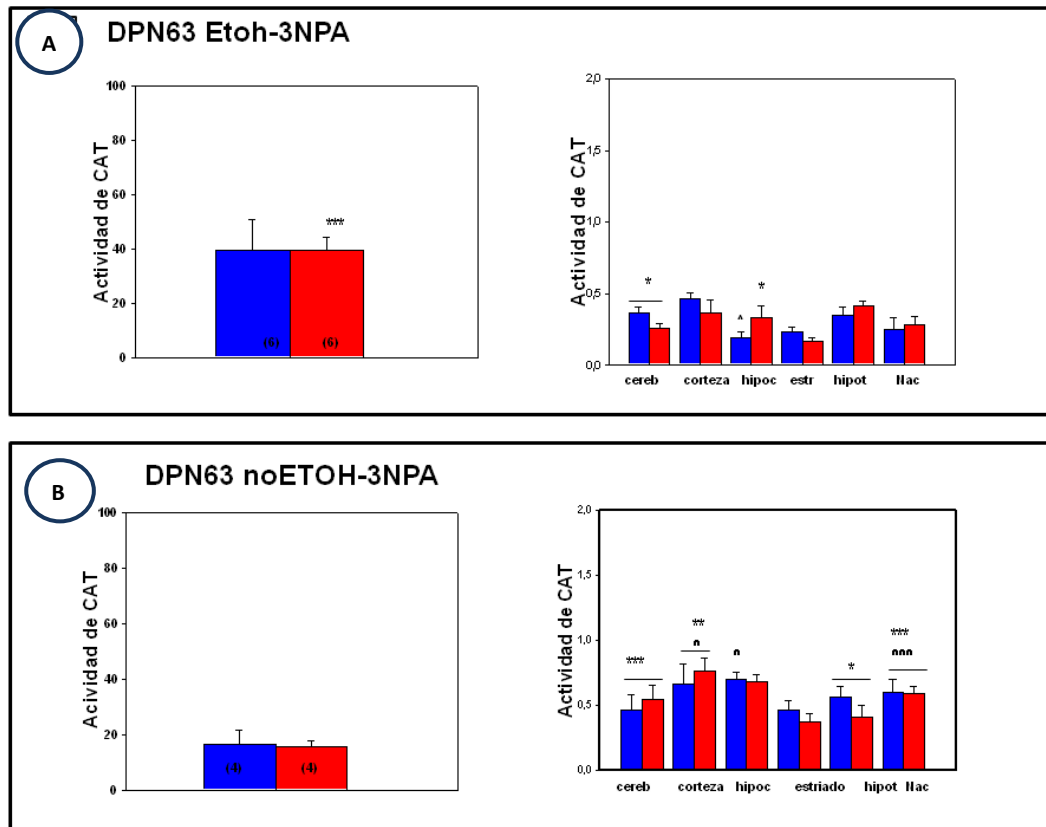


Figura 18: A) Actividad enzimática de CAT en sangre expresada en mmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/gHb (izquierda) y cerebral (derecha) expresada en mmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína en los animales inyectados con la dosis de 3NPA 10 mg/kg y expuestos al esquema de consumo voluntario. \*Indica una diferencia significativa de los animales inyectados con SAL en la misma condición de ETOH a \*\*\*  $p < 0,0001$ . B) Actividad enzimática de CAT en sangre (izquierda) y cerebral (derecha) en los animales noETOH inyectados con la dosis de 10 mg/kg 3NPA. Indicado entre paréntesis se señala el número de animales por grupo.

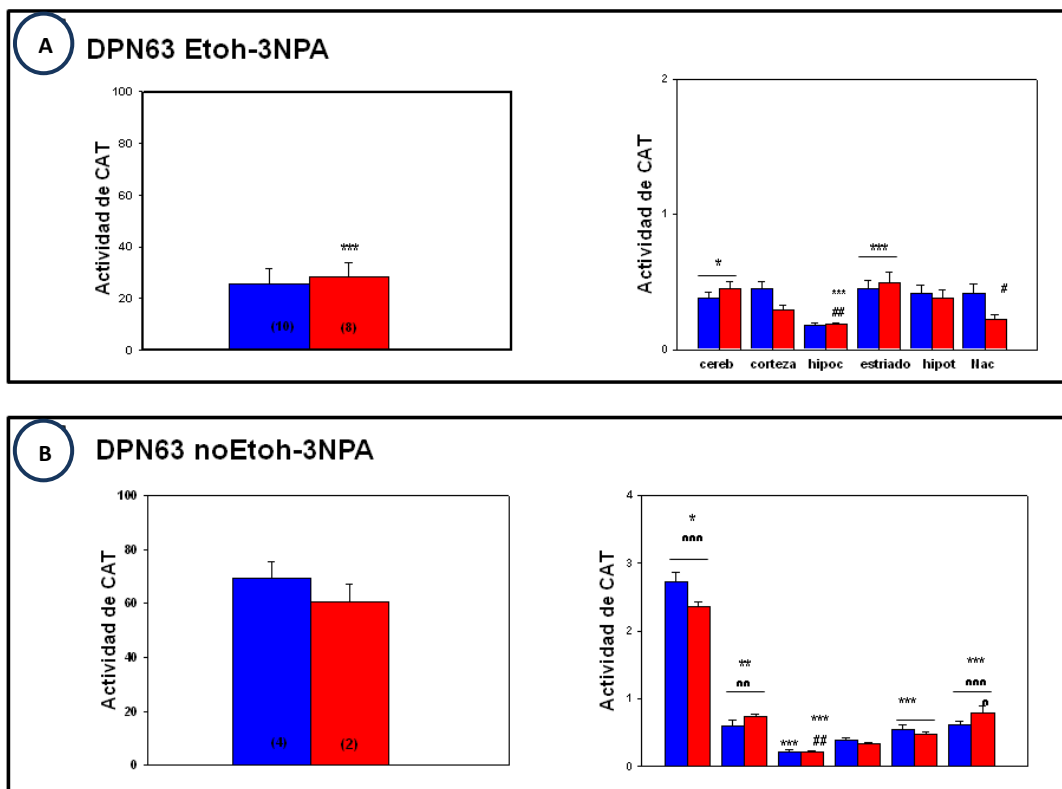


Figura 19: A) Actividad enzimática de CAT en sangre (izquierda) expresada en  $\text{mmolH}_2\text{O}_2/\text{min/gHb}$  y cerebral expresada en  $\text{mmolH}_2\text{O}_2/\text{min/mg proteína}$  (derecha) en los animales inyectados con la dosis de 30 mg/kg y expuestos al esquema de consumo voluntario. \* Indica una diferencia significativa de los animales inyectados con SAL en la misma condición etanol a  $*** p < 0,0001$ . B) Actividad enzimática de CAT en sangre (izquierda) y cerebro (derecha) en los animales inyectados con la dosis de 30 mg/kg no sometidos al consumo voluntario. Se indica entre paréntesis el número de animales por grupo.

#### *Actividad enzimática de CAT en cerebro:*

En los datos presentados en la tabla 3, puede observarse la actividad enzimática de CAT en los grupos DPN35, DPN63 ETOH-SAL, DPN63 noETOH-SAL, DPN63 ETOH-AT, DPN63 noETOH-AT, DPN63 ETOH-3NPA, DPN63 noETOH-3NPA (C vs Pb). Se observan incrementos en los grupos expuestos al Pb, con excepción de los animales tratados con AT. En relación a sus controles noETOH, la ausencia de la ingesta de la droga disminuye la actividad de la enzima. Estas observaciones son apoyadas por los datos estadísticos que se presentan a continuación:

La comparación de los grupos DPN35 y los grupos DPN63 noETOH-SAL reveló diferencias significativas en la variable edad en el cerebelo:  $F(1,27)=4,05; p < 0,05$ , corteza prefrontal  $F(1,26)=13,91; p < 0,001$ , cuerpo estriado  $F(1,26)=19,36; p < 0,001$ , y en

hipotálamo  $F(1,26)=33,62$ ;  $p<0,001$ . El análisis de CAT cerebral en el hipocampo demostró un efecto significativo de la edad/ingesta de ETOH  $F(1,26)=13,39$ ;  $p<0,01$  y en la interacción  $F(1,26)=10,82$ ;  $p<0,01$ .

En segundo lugar, se compararon los grupos DPN35 y DPN63 ETOH-SAL, lo cual demostró un efecto significativo de la edad en cerebelo  $F(1,27)=643,45$ ;  $p<0,001$ , cuerpo estriado  $F(1,27)=49,00$ ;  $p<0,001$ , hipotálamo  $F(1,27)=18,46$ ,  $p<0,001$  y núcleo accumbens  $F(1,9)=12,67$ ;  $p<0,01$ , sin diferencias en la corteza prefrontal, y un efecto significativo de grupos:  $F(1,27)=10,15$ ;  $p<0,01$  en el hipocampo.

Por último, se analizó la actividad enzimática cerebral de CAT en los grupos de animales adultos DPN63 utilizando un ANOVA de 3 vías, de manera separada para cada área cerebral. En el cerebelo, se observaron efectos significativos de los tratamientos:  $F(2,59)=19,81$ ;  $p<0,0001$ , ETOH:  $F(1,59)=19,81$ ;  $p<0,01$  y de la interacción tratamiento x ETOH:  $F(2,59)=4,92$ ;  $p<0,01$ . El análisis estadístico de la corteza prefrontal, demostró un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,59)=4,82$ ;  $p<0,05$  y en la interacción tratamiento x ETOH:  $F(2,59)=7,00$ ;  $p<0,002$ . La comparación de los datos para el hipocampo reveló un efecto significativo de tratamiento:  $F(2,59)=15,82$ ;  $p<0,0001$ , grupo x ETOH:  $F(1,59)=4,61$ ;  $p<0,05$ , tratamiento x ETOH:  $F(2,59)=9,68$ ;  $p<0,001$  y la interacción global entre los 3 factores:  $F(2,59)=9,49$ ;  $p<0,001$ . En el cuerpo estriado, hubo un efecto significativo de los tratamientos:  $F(2,59)=18,62$ ;  $p<0,0001$ , ETOH:  $F(1,59)=4,42$ ;  $p<0,05$  y tratamiento/ETOH:  $F(2,59)=5,24$ ;  $p<0,01$ , mientras que el análisis del hipotálamo reveló un efecto significativo del tratamiento:  $F(2,59)=38,05$ ;  $p<0,0001$  y el tratamiento/ETOH:  $F(2,59)=13,81$ ;  $p<0,0001$ . Finalmente en núcleo accumbens, solo se evidenció la interacción tratamiento/ETOH:  $F(2,39)=6,21$ ;  $p<0,01$ .



**TABLA 3: Actividad enzimática de CAT en sangre y tejido cerebral.** Actividad enzimática de CAT en sangre expresada como mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/g de Hb. Los números entre paréntesis indican el número de animales por grupo. \$ denota diferencia significativa comparado con los animales periadolescentes en el DPN35 en los animales del mismo grupo en las condiciones de consumo de ETOH y no ETOH \$\$\$  $p < 0,0001$ . \* Indica una diferencia significativa de los animales inyectados con SAL en el mismo grupo y en la condición de consumo o no de ETOH a \*\*\*  $p < 0,0001$ . #denota una diferencia significativa de animales C con la misma condición de tratamiento y consumo o no de ETOH a # $p < 0,05$ , ##  $p < 0,001$ , ### y  $p < 0,0001$ . La actividad cerebral de CAT fue expresada como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mmol/ml/mg de proteína. Entre paréntesis se indica el número de animales por grupo, extensivo a todas las demás regiones del mismo grupo, excepto para el Nac, donde se indica el número correspondiente de animales para esta área que difiere del resto. \$ Denota una diferencia significativa en los animales del mismo grupo a diferentes edades en las condiciones de consumo de ETOH y no ETOH \$\$\$  $p < 0,0001$ . \* Indica una diferencia significativa de los animales controles inyectados con SAL en la misma condición ETOH a \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , y \*\*\*  $p < 0,0001$ . ^ diferencia significativa del mismo grupo en la condición no ETOH ^  $p < 0,05$ , ^^  $p < 0,001$ , y ^^  $p < 0,0001$ . #denota una diferencia significativa del grupo C en la misma condición de tratamiento y ETOH a # $p < 0,05$ , ##  $p < 0,001$ , ### y  $p < 0,0001$ .

### *Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo*

En la figura 20 se representan las secciones histológicas pertenecientes al cuerpo estriado de los grupos C y de los animales expuestos a Pb luego de la administración crónica de 3NPA (20 mg/kg) así como sus respectivos C inyectados con SAL, tanto de animales expuestos al esquema de consumo voluntario de ETOH (paneles superiores), como en sus contrapartes no ETOH (paneles inferiores). El análisis estadístico reveló un efecto significativo del tratamiento:  $F(1,10)=8,64$ ;  $p < 0,02$ . Además, el análisis separado del ANOVA de dos vías para los grupos ETOH y no ETOH, reveló un efecto significativo del tratamiento:  $F(1,5)=11,07$ ;  $p < 0,02$  sólo en las ratas que no estuvieron expuestas al paradigma de libre elección de ETOH.

Por otra parte, los efectos de la administración de las dosis de 3NPA (10 y 30 mg/kg) en el estriado se muestran en la figura 21 tanto en los grupos ETOH como en los no ETOH. El análisis del ANOVA de tres vías para la dosis de 10 mg/kg, reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,8)=7,52$ ;  $p < 0,05$ , una diferencia no significativa en la variable de ETOH:  $F(1,8)=5,11$ ;  $p=0,053$ , y un efecto significativo del tratamiento:  $F(1,8)=11,03$ ;  $p < 0,05$ . El análisis del ANOVA separado para los grupos de ETOH y no ETOH no mostró efectos significativos en ninguno de los parámetros analizados. Con respecto al análisis realizado para la administración de la dosis de 30 mg/kg, el ANOVA de tres vías reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,8)=5,58$ ;  $p < 0,05$ , una diferencia no significativa en la variable de ETOH:  $F(1,8)=1,08$ ;  $p=0,33$ , y un efecto

significativo del tratamiento:  $F(1,8)=67,46$ ;  $p<0,001$ , así como una interacción ETOH x dosis del tratamiento  $F(1,8)= 8,91$ ;  $p<0,05$ . El análisis de los ANOVAs separados realizados para los grupos ETOH y noETOH reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,4)=7,92$ ;  $p<0,05$ , una diferencia significativa de tratamiento:  $F(1,4)=59,11$ ;  $p<0,01$ , y un efecto no significativo en la interacción grupo x dosis de tratamiento:  $F(1,4)=1,40$ ;  $p=0,30$ . En contraste, los grupos noETOH mostraron sólo un efecto significativo de la dosis del tratamiento:  $F(1,4)=14,55$ ;  $p<0,05$ . Si bien el número de neuronas no fue estadísticamente diferente, la observación visual del cuerpo estriado sugirió la presencia de una palidez inducida por la dosis de 30 mg/kg en la región dorsolateral del cuerpo estriado en los límites del cuerpo calloso.

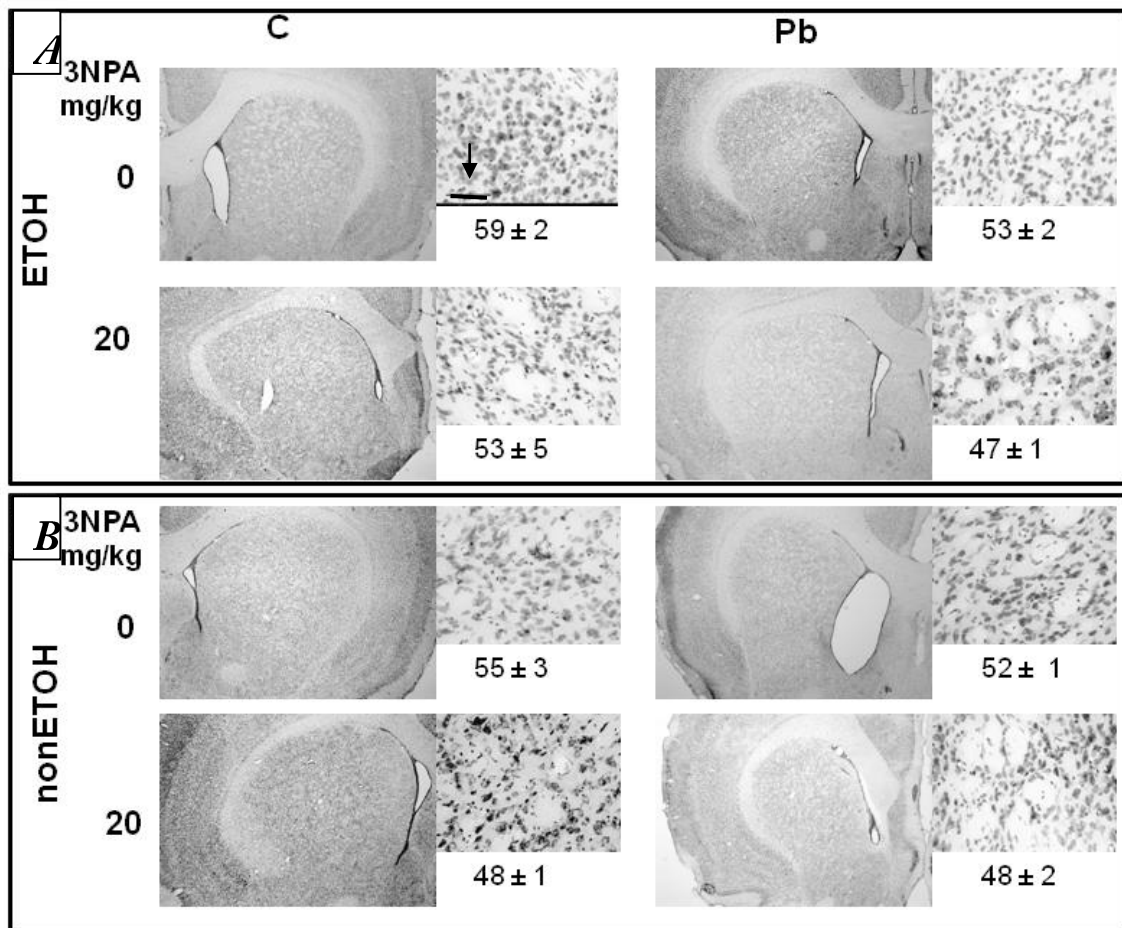


Figura 20: Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo de animales inyectados con SAL y 3-NPA (20 mg/kg s.c. por 4 días). El gráfico representa secciones coronales del estriado en 2,5x y 40x. Los valores (media ± ES) indican el número total de neuronas por mm<sup>2</sup> de un promedio de 2-3 animales por condición contados en cuatro campos diferentes a 40x (escala representativa barra = 65 micras, en el gráfico señalado con una flecha negra).

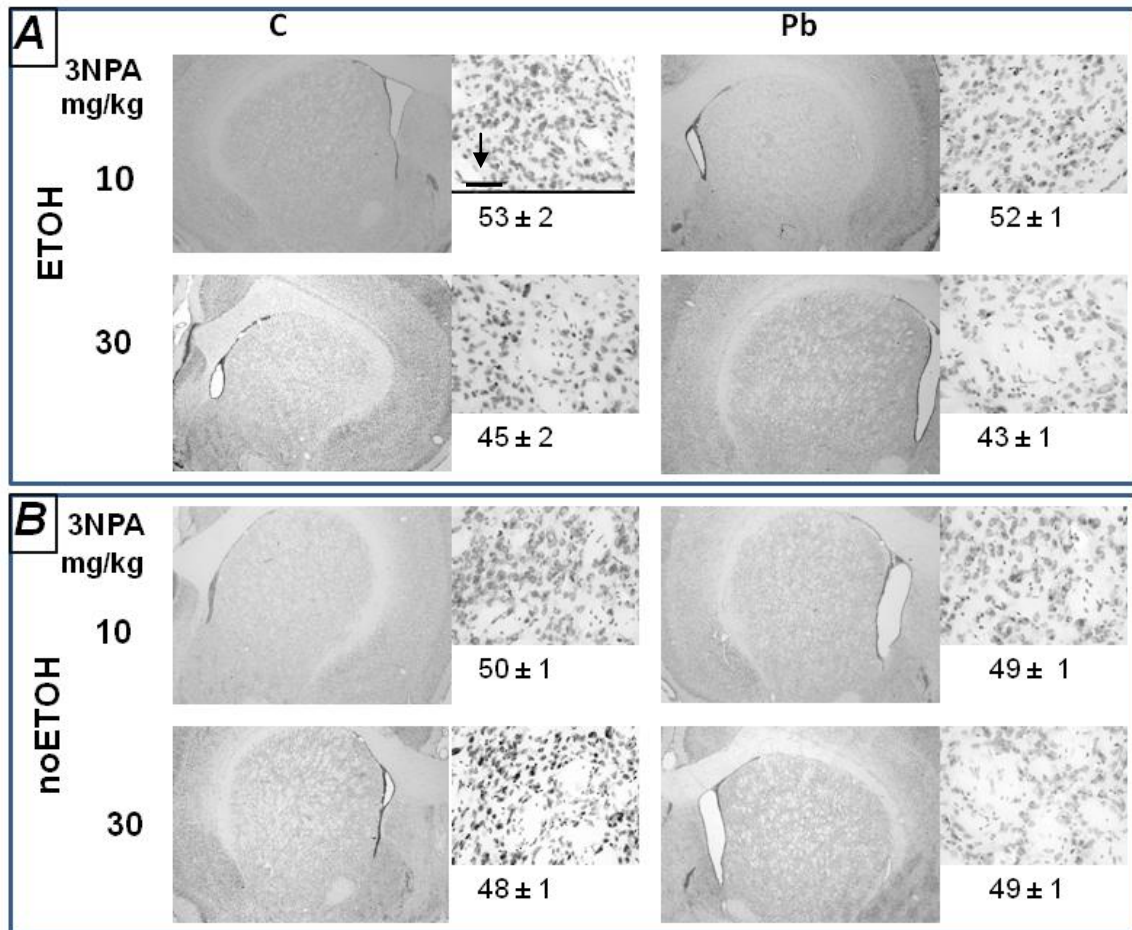


Figura 21: Estudio de neurotoxicidad del 3NPA con violeta de cresilo de animales inyectados con SAL y 3-NPA (10 y 30 mg/kg s.c. por 4 días). El gráfico representa secciones coronales del estriado en 2,5x y 40x. Los valores (media  $\pm$  ES) indican el número total de neuronas por  $\text{mm}^2$  de un promedio de 2-3 animales por condición contados en cuatro campos diferentes a 40x (escala representativa barra= 65 micras, en el gráfico señalado con una flecha).

### Conclusiones y discusiones parciales:

Los resultados obtenidos al analizar los parámetros bioquímicos del modelo demuestran, que la exposición a Pb no fue capaz de inducir alteraciones morfológicas/bioquímicas importantes tanto en las madres como en las crías, esto significa que todos los cambios y efectos que observamos se van a producir con niveles de Pb en sangre ligeramente por encima de los niveles considerados como seguros por el CDC. Por consiguiente, las alteraciones encontradas en estos animales adquieren



relevancia puesto que estos niveles sanguíneos de Pb reflejarían una exposición a concentraciones que no inducen manifestaciones clínicas evidentes de la exposición, pero que son suficientes para evidenciar respuestas alteradas en caso de eventos desafiantes en la vida futura del organismo. Es importante destacar que de acuerdo a la toxicocinética del Pb, en el momento de la toma de muestra (DPN 35) si bien la exposición al Pb ha cesado 10 días antes, el metal podría estar aún presente en sangre y estaría intercambiándose con los tejidos blandos entre ellos cerebro, riñón y médula (Liu y cols, 2008). Así, aun cuando los niveles obtenidos en sangre han declinado considerablemente, encontrándose en su mayoría por debajo del límite de cuantificación: 1,80 µg/dl el metal estaría presente en los órganos blanco ejerciendo sus efectos tóxicos.

En relación a las manipulaciones farmacológicas de CAT los resultados obtenidos, proporcionan nuevas evidencias de la participación de CAT en el elevado consumo voluntario de ETOH, en ratas expuestas perinatalmente a Pb. Al respecto, se observó que el pre-tratamiento con el antagonista de CAT: AT fue capaz no solo de atenuar el incremento de la ingesta voluntaria de ETOH, sino también el aumento de la actividad de CAT en sangre y en cerebro (particularmente en cerebelo e hipocampo) observado selectivamente, en ratas expuestas a Pb. Por el contrario, la sobreactivación de CAT, con 3NPA no sólo fue capaz de producir un incremento en el consumo de los animales que estuvieron expuestos al Pb sino también, de manera interesante, en los animales C que no presentaban una historia previa de consumo elevado. Estas alteraciones observadas, no pueden ser atribuidas a cambios en la toxicocinética del ETOH, debido a que no se observaron diferencias en los niveles de ETOH en sangre entre los C y los animales expuestos a Pb, lo cual sugiere de alguna manera que la interacción entre el ETOH y el Pb se produciría a nivel central. Más interesante es aún el hecho de que estos efectos estuvieron asociados con niveles de Pb en sangre que se encuentran por debajo del umbral presente en organismos en desarrollo, lo cual representa una prueba más de que aun a niveles sanguíneos bajos se manifiestan efectos adversos sutiles (Canfield y cols. 2003). Por lo tanto, es importante destacar que la huella (*"imprinting"*) causado por la exposición al Pb durante el desarrollo, podrían ser responsables de alteraciones permanentes en la ingesta de ETOH. Por una parte, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que animales expuestos a Pb presentan una mayor sensibilidad a los efectos ansiolíticos, motivacionales y sedantes del ETOH (Virgolini y cols, 1999). En segundo lugar, el hallazgo de que los animales

expuestos al Pb prefieren consumir cantidades similares de sacarosa que sus contrapartes C proporciona una evidencia adicional de la selectividad de ETOH como reforzador positivo en ratas expuestas al Pb. Por último, y aunque los niveles de ETOH en sangre que se alcanzaron luego de la sesión de ingesta voluntaria de ETOH fueron bajos en animales expuestos al Pb, pudo comprobarse que fueron suficientes para inducir hiperlocomoción selectivamente en estos animales. Esta hiperlocomoción se observó en los primeros 30 min de la sesión, lo cual se corresponde con el tiempo en el cual el ETOH alcanza su concentración máxima en sangre. A partir de estas evidencias sostenemos que las alcoholemias que se alcanzaron son farmacológicamente relevantes y capaces de inducir efectos psicoestimulantes. Además, cabe destacar que la gran variabilidad observada podría deberse a diferencias interindividuales en el consumo de ETOH y en la preferencia al mismo puesto que, como se explicó anteriormente, en el paradigma que empleamos la ingesta de ETOH es voluntaria.

Por otra parte, pudo observarse que en el DPN35, se produjo un incremento de la actividad de CAT en sangre preferencialmente en el grupo expuesto a Pb, momento que de acuerdo a la toxicocinética del Pb, el metal se encuentra presente en sangre. Al respecto, se ha informado en ratones que una única inyección de 100 mg/kg de Pb, fue suficiente para producir un incremento de la actividad de CAT en sangre (Correa y cols, 1999a, 2000). De manera interesante, hemos logrado un efecto similar exponiendo a los animales a Pb durante la gestación y la lactancia. Este efecto se mantuvo y se potenció en la edad adulta, pero solo en el grupo que ha consumido ETOH, ya que en el grupo que no consumió ETOH esta diferencia en la actividad desapareció, por lo que se trataría de un efecto directamente relacionado con la presencia concomitante del ETOH, y que pudo ser bloqueado por el AT y fue restablecido nuevamente con la administración de 3NPA.

En relación a las manipulaciones farmacológicas, se ha descrito que AT induce una inhibición irreversible de la actividad catalítica por reacción con el complejo I CAT-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La falta de efecto del AT que observamos en los animales C, sugiere que la inhibición de la enzima requiere ya sea de una ingesta elevada de ETOH para que se ponga de manifiesto el antagonismo y resulte en una reducción del mismo o de un contenido elevado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cerebro. Por lo tanto, podemos especular que la mayor inhibición de AT ejercida sobre la ingesta de ETOH en los animales expuestos a Pb en comparación con los C, podría estar relacionada con una mayor producción de EROs (principalmente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), diferencialmente en las ratas expuestas a Pb. Con respecto a

esto, hemos demostrado una elevada producción de EROs en sangre, en respuesta a diferentes concentraciones de ETOH, en animales de 35 días de edad expuestos a Pb en comparación con sus respectivos C (datos no mostrados). Asimismo, un trabajo realizado por Tampier (Tampier y cols, 1995), evidenció que el AT es capaz de reducir el consumo de ETOH en ratas seleccionadas genéticamente por su alto consumo de ETOH (UchB) no así en bajas bebedoras (UchA). Adicionalmente, estos datos contrastan con evidencias que sugieren que la especificidad del efecto del AT sobre el consumo de ETOH es cuestionable, ya que el AT también fue capaz de reducir la ingesta de sacarina y comida en ratas. Sin embargo, en este trabajo la dosis que se utilizó de AT fue de 1 g/kg, (4 veces más elevada que la empleada en este trabajo de tesis), lo cual podría explicar los resultados obtenidos. Éstos se encuentran sustentados por la prueba de consumo de sacarosa, en la que hemos demostrado que la administración de AT no fue capaz modificar las propiedades motivacionales a reforzadores naturales. Por lo tanto, podemos concluir que el efecto observado del AT sobre el consumo voluntario de ETOH sería selectivo sobre esta droga.

Por otro lado, como ya se mencionó, sólo unos pocos trabajos han abordado las consecuencias farmacológicas de la sobreactivación de la actividad enzimática de CAT, que puede realizarse ya sea a través de la administración aguda de Pb, la cual produce un aumento en la actividad catalítica CAT, que se traduce en una potenciación de los efectos motores estimulantes del ETOH, tras la administración de esta sustancia i.p en ratones Swiss (Correa y cols, 1999b; Correa y cols, 2004b; Correa y cols, 2005). Otra estrategia que también se ha empleado para incrementar la actividad, se basa en aumentar los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la hiperoxia normobárica, la cual ha producido también, un incremento en la respuesta motora al ETOH (Pastor y cols, 2002; Aragón y cols, 2005). Existen además otras sustancias, como el 3NPA cuya utilización produce un incremento de la actividad de CAT, la cual se correlaciona con un aumento de los efectos psicoestimulantes locomotores del ETOH en ratones (Manrique y cols, 2006a). Los presentes resultados, si bien abordados desde diferentes estudios comportamentales, coinciden con los de Manrique y cols. puesto que en ambos estudios, se produce un incremento de la actividad catalítica de CAT, lo cual es acompañado en su caso por una hiperlocomoción tras la administración s.c. de 3NPA previo a la administración i.p. de ETOH; y en nuestro caso de un incremento marcado del consumo voluntario de ETOH, no sólo en los animales expuestos a Pb, sino de manera interesante también en los C. Estas evidencias estarían indicando que el incremento en la actividad de CAT se

correlaciona con un aumento en el consumo voluntario de ETOH no sólo en animales que presentan una historia previa de consumo voluntario del mismo sino también en animales que no han sido altos consumidores de ETOH. Al igual que con AT, la prueba de sacarosa permitió evaluar si la administración de esta sustancia es capaz de modificar las propiedades motivacionales a reforzadores naturales así como las propiedades organolépticas. Nuevamente no se evidenciaron diferencias en el consumo de sacarosa entre animales inyectados con SAL y con 3NPA, lo que permite afirmar que los efectos observados serían específicos del ETOH. En relación a las propiedades del 3NPA de los datos estadísticos se desprende que existe un efecto de la droga, es decir que efectivamente el 3NPA redujo el número de células estriatales si se compara con el grupo que no recibió tratamiento; sin embargo, no se evidencia un efecto con relación al consumo de ETOH ni tampoco relacionado a la exposición o no al Pb. Por lo tanto, seleccionando la dosis de 20 mg/Kg mediante experimentos piloto de dosis-respuesta se logró una activación de CAT, con la mínima neurotoxicidad asociada a un aumento de la ingesta de ETOH. Finalmente, y con referencia a consideraciones anatómicas, es necesario mencionar que el estriado área en donde se observó un incremento de la actividad de CAT se trata de un área rica en SDH como se mencionó con anterioridad, por lo cual como consecuencia de su inhibición por parte del 3NPA se presentaría una mayor producción de EROs, y como resultado de esto se observó una activación de CAT como resultado de un mecanismo compensatorio de detoxificación.

En cuanto al patrón diferencial de la actividad enzimática de CAT en los animales expuestos a Pb, se evidencia que este metal induciría daño preferentemente en hipocampo y cerebelo, siendo algunas características clínicas de la exposición al Pb atribuidas a estas regiones anatómicas específicas (Finkelstein y cols, 1998). Con respecto al ETOH, la corteza prefrontal y el hipocampo se encuentran entre las zonas más susceptibles (Jamal y cols, 2007), las cuales forman parte de aéreas mesocorticolímbicas, que también han sido identificadas como de mayor actividad de CAT (Zimatkin y cols, 1996). Al respecto, se encontró que la exposición a Pb, aumenta la actividad de CAT en el cerebelo en crías de 35 días lo cual ocurre en paralelo con la mayor actividad de CAT en eritrocitos. Posteriormente, la ingesta de ETOH en el DPN63 en los animales expuestos a Pb no sólo incrementó la actividad de CAT en sangre sino también en cerebelo e hipocampo, ambos sitios identificados en los efectos deletéreos tanto de Pb como de ETOH (Oberto y cols, 1996; Pintala y cols, 1997). La administración de AT fue capaz de revertir esta actividad diferencial lo cual se

correlaciona con lo observado en el consumo de ETOH. El hipocampo es un área que recibe extensas inervaciones dopaminérgicas y glutamatérgicas, que participan en los procesos de memoria y aprendizaje así como también en procesos involucrados en la adicción (Chao y cols, 2007; Jamal y cols, 2007; Sharifi y cols, 2002; Verina y cols, 2007). Mientras que en cerebelo, se ha observado que la exposición prolongada a ETOH, produce cambios degenerativos sobretodo en la vermis cerebelar, que afecta a funciones cerebelares como la coordinación motora y el aprendizaje motor (Sullivan y cols, 1995). Se ha visto que más del 40% de los pacientes alcohólicos tiene algún tipo de atrofia cerebelar y que este daño está relacionado con la formación de ACD (ForFrias y cols 2003). Las células de Purkinje contienen altos porcentajes de ALDH2 baja Km (la cual es lenta para metabolizar ACD) y se ha detectado un porcentaje significativo de la formación de aductos del ACD en la capa granular y molecular, sugiriendo que el ACD puede ser formado allí localmente (Rintala y cols, 1997, 2000). Por lo tanto, el fundamento de la determinación de la actividad cerebral de CAT en regiones del cerebro y no en homogenatos de cerebro entero, responde a que la oxidación del ETOH no se produce con la misma eficiencia en todo el cerebro, existiendo áreas en donde es más baja y otras en donde es mayor. Por consiguiente, se han seleccionado aquellas regiones que reportaron ser afectadas tanto por la exposición al Pb como por ETOH, así como también áreas que se encuentran implicadas en la vía mesocorticolímbica y que presentan una mayor actividad de CAT (Zimatkin y Lindros, 1996).

Finalmente, el análisis de CAT cerebral en el hipocampo demostró un efecto significativo de la edad/ingesta de ETOH lo que sugiere una respuesta diferencial de la actividad de CAT en esta área en las edades analizadas. Al respecto, de acuerdo a algunos resultados se ha sugerido que el hipocampo sería un área susceptible al estrés oxidativo dependiente de la edad (Hussain y cols, 1995) al igual que la actividad de CAT. Se ha observado que hay una disminución de la actividad de CAT con la edad y en diferentes regiones en cerebro de ratón (Nistico y cols, 1992; Cand y Verdeti, 1989, Hussain y cols, 1995). Se ha reportado que inmediatamente después del nacimiento los niveles de CAT son elevados y luego decrecen al DPN 30, efecto que se observa en varias regiones del SNC (Maestro y cols, 1986). Asimismo se ha observado que la actividad de la enzima es más elevada en el cerebro fetal que en el cerebro de un animal adulto (Gill y cols, 1992; Del Maestro y McDonald, 1987).

En conclusión, estos resultados proporcionan evidencias que apoyan la participación de un mecanismo mediado por CAT (e indirectamente por ACD) en el

efecto de las propiedades motivacionales de ETOH, principalmente sobre el consumo del mismo en animales expuestos perinatalmente a Pb. Esta interacción puede ser mediada tanto por las propiedades antioxidantes así como por las metabólicas de la enzima lo cual parece ser determinante en el consumo de ETOH, el cual estaría regulado principalmente por la generación de ACD.

*Como conclusión parcial: CAT tendría un rol crítico en el consumo de ETOH, ya que el pre tratamiento con AT fue capaz de inhibir el alto consumo del mismo registrado en los animales expuestos a Pb así como también revirtió las diferencias observadas en la actividad de la enzima. Además el pretratamiento con 3np fue capaz de incrementar el consumo de ETOH registrado en los animales expuestos a Pb y controles y fue capaz de aumentar la actividad de CAT en sangre y estriado en relación a los controles.*

		<u>SAL</u>		<u>AT</u>		<u>3NPA</u>		
		<i>DPN 35</i>	<i>DPN63d noEtOH</i>	<i>DPN63 EtOH</i>	<i>DPN63 noEtOH</i>	<i>DPN63dEtOH</i>	<i>DPN63noEtOH</i>	<i>DPN63 EtOH</i>
<b>Actividad de CAT en sangre</b>	C	47,3 ± 8,0(8)	45,1 ± 10,6(5)	40,2 ± 8,1(9)	32,7 ± 1,9(4)	0,47 ± 0,07(4)	69,4 ± 5,9(3)	25,8 ± 5,9(4)
	Pb	191,5 ± 26,5(8) <sup>#sss</sup>	37,8 ± 6,1(5) <sup>·</sup>	449,5 ± 91,6(6) <sup>###</sup>	33,6 ± 7,3(4)	0,26 ± 0,05(8) <sup>***</sup>	60,7 ± 6,3(3)	28,3 ± 5,7(4) <sup>***</sup>
<b>Actividad de CAT en cerebro</b>								
<b>Cerebelo</b>	C	0,49 ± 0,08(8)	1,90 ± 0,48(8)	0,56 ± 0,11(8) <sup>^^^</sup>	0,39 ± 0,06(4) <sup>***</sup>	0,47 ± 0,07(8) <sup>*</sup>	2,72 ± 0,14(5) <sup>***</sup>	0,38 ± 0,05(4)
	Pb	1,08 ± 0,21(7)	1,97 ± 0,32(7)	1,02 ± 0,12(8) <sup>^^^</sup>	0,32 ± 0,15(3) <sup>***</sup>	0,26 ± 0,05(8) <sup>*</sup>	2,36 ± 0,07(4) <sup>***</sup>	0,45 ± 0,05(4)
<b>Corteza</b>	C	0,59 ± 0,03	0,34 ± 0,07	0,50 ± 0,06	0,66 ± 0,07	0,86 ± 0,12 <sup>^</sup>	0,60 ± 0,08 <sup>*</sup>	0,45 ± 0,05 <sup>^</sup>
	Pb	0,58 ± 0,05	0,34 ± 0,09	0,44 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,30 ± 0,10 <sup>^</sup>	0,73 ± 0,04 <sup>*</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>^</sup>
<b>Hipocampo</b>	C	0,37 ± 0,03	1,24 ± 0,19 <sup>sss</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>^^^</sup>	0,14 ± 0,09 <sup>***</sup>	0,63 ± 0,06 <sup>^</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>***</sup>	0,18 ± 0,02
	Pb	0,54 ± 0,10	0,58 ± 0,10 <sup>#</sup>	0,90 ± 0,18 <sup>#</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>*</sup>	0,42 ± 0,10 <sup>*</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>**</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>**</sup>
<b>Estriado</b>	C	0,48 ± 0,09	2,15 ± 0,52	1,98 ± 0,20	0,20 ± 0,04 <sup>***</sup>	2,16 ± 0,40	0,38 ± 0,04 <sup>**</sup>	0,45 ± 0,07 <sup>***</sup>
	Pb	0,82 ± 0,20	2,75 ± 0,61	2,12 ± 0,27	0,24 ± 0,08 <sup>***</sup>	2,76 ± 0,62	0,34 ± 0,02 <sup>**</sup>	0,50 ± 0,07 <sup>***</sup>
<b>Hipotalamo</b>	C	1,07 ± 0,05	4,47 ± 0,90	2,04 ± 0,34 <sup>^^^</sup>	0,43 ± 0,16 <sup>***</sup>	1,75 ± 0,76 <sup>^</sup>	0,54 ± 0,07 <sup>**</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>**</sup>
	Pb	47,3 ± 8,00	3,68 ± 0,50	1,88 ± 0,23 <sup>^^^</sup>	0,32 ± 0,07 <sup>***</sup>	1,33 ± 0,15 <sup>^</sup>	0,48 ± 0,04 <sup>**</sup>	0,38 ± 0,06 <sup>**</sup>
<b>Núcleo Accumbens</b>	C	0,12 ± 0,03(4)	0,11 ± 0,03(8)	0,43 ± 0,03(2)	0,20 ± 0,04(4)	0,27 ± 0,12(6)	0,62 ± 0,06(5) <sup>***</sup>	0,42 ± 0,07(4) <sup>^</sup>
	Pb	0,14 ± 0,06(4)	0,27 ± 0,04(7)	0,29 ± 0,10(3)	0,24 ± 0,01(3)	0,20 ± 0,06(4)	0,79 ± 0,11(4) <sup>***</sup>	0,22 ± 0,03(3) <sup>^</sup>





Capítulo II: “*Evaluación de la abundancia relativa de CAT cerebral al final del esquema de consumo voluntario de ETOH en condiciones basales y en respuesta a manipulaciones farmacológicas de la enzima*”.

## Capítulo II: “Evaluación de la abundancia relativa de CAT cerebral al final del esquema de consumo voluntario de ETOH en condiciones basales y en respuesta a manipulaciones farmacológicas de la enzima”.

### Marco teórico:

Como se mencionó anteriormente, la enzima CAT se encuentra localizada principalmente en la matriz de los peroxisomas en las células hepáticas de mamíferos, incluidos humanos y ratas (Yokoda y Fahimi, 1981; Bendayan y Reddy, 1982; Yamamoto y cols, 1988), células de riñón de bovino y ratas (Usuda y cols, 1988; Zaar y cols, 1992), en células neuronales en los orgánulos correspondientes conocidos como microperoxisomas (Novikoff y Novicoff, 1973; Gaunt y de Duve, 1976) de rata (Moreno y cols, 1995; Zimatkin y Lindros, 1996) y de humanos (Houdou y cols, 1991) y en los neutrofilos humanos (Ballinger y cols, 1994). También se ha encontrado en el citosol de hepatocitos de ovejas (Roels y cols, 1986), en monos Rhesus (Roels y cols, 1977) y conejillo de indias (Roels y cols, 1977; Geerts y cols, 1984; Yamamoto y cols, 1988; Bulitta y cols, 1996).

La presencia de CAT en regiones cerebrales ha sido estudiada de manera bioquímica, histoquímica e inmunohistoquímica en animales adultos (McKenna y cols, 1976; Gaunt y cols, 1976; Zimatikin y cols, 1996; Moreno y cols, 1995), en cerebros en desarrollo (Arnold y cols, 1978) y en cultivos de células cerebrales de ratas fetales (Aspberg y cols, 1993; Hamby-Mason y cols, 1997). Si comparamos la expresión de CAT en las secciones de cerebro, en relación a la observada en hígado es relativamente menor (Zimatkin y cols, 1996). La distribución cerebral de CAT fue estudiada en un principio mediante métodos bioquímicos (Gaunt y cols, 1976; Brannan y cols, 1981). Años posteriores, a través del estudio de la distribución regional de la enzima, por métodos inmunocitoquímicos se reveló que esta no presenta una distribución uniforme y que se encontraban zonas de mayor expresión que otras. Además, el estudio de la distribución regional de CAT reveló un cierto paralelismo con los datos bioquímicos previamente encontrados. Así el trabajo publicado por Moreno (Moreno y cols, 1995) demostró inmunoreactividad en todas las estructuras neuronales analizadas, tanto a nivel neuronal como a nivel glía, siendo ciertas aéreas más reactivas que otras. Se observó que

en roedores, la enzima se expresa de manera altamente selectiva en determinadas áreas como en células hipocámpales piramidales de CA3, a nivel hipotalámico entre otras, mientras que en otras áreas como núcleo accumbens se encuentra una baja expresión. Trabajos posteriores (Zimatkin y cols, 1996), mediante estudios también de inmunohistoquímica se focalizaron en el desequilibrio existente entre la producción y la eliminación de ACD a partir de la oxidación de ETOH, por medio de CAT. Nuevamente se observó una distribución diferencial de la enzima. Por ejemplo áreas como el núcleo del tracto solitario, área postrema, núcleo del raphe dorsal y núcleo hipotalámico y ATV presentan la mitad de sus células CAT positivas y hasta en algunas se aproximan a su expresión en hepatocitos. Estas áreas presentan la particularidad de ser áreas con una importante cantidad de neuronas aminérgicas. Otras regiones ricas encontradas fueron el *locus ceruleus* y la sustancia *nigra pars reticulata*, que también son áreas aminérgicas. Sin embargo, otras áreas aminérgicas como núcleo accumbens, núcleo caudado putamen y la eminencia media presentaron una baja expresión. Este tipo de estudios permitieron concluir, que la enzima se localiza principalmente en los peroxisomas de neuronas adrenérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas del tronco cerebral.

Por otra parte, los resultados obtenidos demostraron que la localización de CAT contrastaba con la de ALDH (Zimatkin y cols, 1995), la cual presenta en relación a CAT una baja expresión en neuronas aminérgicas tanto en ratas (Zimatkin y cols, 1991; 1992) como en humanos (Motavkin y cols, 1990). Además, contrasta su localización con la de las otras dos enzimas que son productoras potenciales de ACD, como la ADH y CYP450. La ADH, como se mencionó con anterioridad presenta una distribución relativamente nula a nivel del SNC, localizándose principalmente a nivel de las células de Purkinje, neuronas de la región media cerebral cortical y cuerpos mamilares neuronales (Bullher y cols, 1983; Kerr y cols, 1989). Mientras que la CYP450, se localiza principalmente en células gliales, endoteliales y neuropilos (Hansson y cols, 1990).

Esto ha llevado a numerosos autores a plantear la posibilidad de que la distribución de CAT en neuronas aminérgicas pobres en ALDH, podría llevar a una acumulación de ACD en determinadas áreas cerebrales aminérgicas implicadas en el reforzamiento con la consecuente implicancia en el consumo de ETOH (Zimatkin y col, 1996; Moreno y col, 1995; Heap y col, 1995). Lo que ha conducido, como se

mencionó con anterioridad a que algunos autores (Amit y cols, 1971; Hashimoto y cols, 1989; Heap y cols, 1995; Zimatkin y cols, 1996) planteen la posibilidad de que el sistema catecolaminérgico cerebral se encuentre implicado en los efectos inducidos por ETOH en el SNC. Por lo cual, si bien la actividad de CAT es relativamente baja (Gaunt y Duve, 1976; Aragón y cols, 1992; Gill y cols, 1992) esta actividad podría tener una importancia funcional a nivel local.

*Por lo expuesto, esperaríamos que se observe una expresión diferencial en determinadas áreas, la cual además estará condicionada por el tratamiento experimental (Pb vs C), el consumo de ETOH y el tratamiento farmacológico con SAL, AT o 3NPA.*

En base a estas evidencias el OBJETIVO de esta sección fue determinar si las observaciones relacionadas a la actividad de CAT tanto en condiciones basales como en respuesta a drogas que modulan su actividad, lo cual hemos demostrado, se corresponden con una mayor expresión de la enzima en áreas relacionadas con las propiedades reforzantes de las drogas de abuso en general y de ETOH en particular.

## Materiales y Métodos:

### *Obtención de las muestras y procedimiento*

Luego del tratamiento correspondiente (los grupos se detallan a continuación), los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/Kg i.p) y perfundidos de manera transcardíaca, exponiendo la cavidad torácica y obstruyendo el flujo sanguíneo en la aorta descendente. Cada animal fue perfundido con una solución de salina/heparina (NaCl 0,9%/1000 unidades/l), lo cual permitió lavar el tejido del flujo sanguíneo circulante (aproximadamente 250 ml por animal) y luego una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PB) 0,1 M pH=7,4 (aproximadamente 300-350 ml por cada animal). Los cerebros luego fueron removidos y permanecieron en la solución de paraformaldehído al 4% durante 12 hs a 4 °C, y luego fueron transvasados a una solución de sucrosa al 30% en buffer fosfato (PB) por 72 hs a 4 °C como mínimo hasta el momento en que fueron analizados.

El día del experimento los cerebros fueron retirados de la solución de sucrosa y sometidos a una congelación rápida con aerosol congelante (Biofreetz, Biopack) y adheridos a un soporte (taco del crióstato) con un medio de inclusión crioprotector (Cryoplast, Biopack). Para igualar la temperatura en todo el tejido con el medio de montaje se dejaron las muestras durante 15 a 20 min. Se realizaron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de espesor, utilizando un criostato (Leica CM15105), obteniéndose cortes correspondientes a corteza prefrontal, Núcleo Accumbens (Nac), Estriado dorsal e Hipocampo (CA1 y CA3), utilizando como guía el atlas "The rat brain" (Paxinos et al 2009). Los cortes fueron lavados en tres intervalos de 10 min cada uno con PB 0,01 M. Posteriormente, los cortes fueron incubados en una solución de 10% metanol, 30% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PB por 1 h en agitación para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Luego se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PB 0,01 y los cortes incubados por 2 hs en agitación en una solución de bloqueo específico (1% albumina serica bovina -BSA Tethaedron-, 0,1% Tritón X-100, 10% de suero de cabra -Sigma, Argentina- en PBS 0,01 M). A continuación los cortes fueron incubados durante 24 hs a 4 °C y en agitación constante con un anticuerpo policlonal antiperoxidasa anticatalasa (rabit abcam) en una dilución 1:1500 en PB 0,01 M, conteniendo 0,1% de Tritón x-100 1% suero de cabra, 1% albúmina sérica bovina. Al día siguiente los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min cada vez, e incubados durante 2 hs en agitación con un anticuerpo secundario biotinilado anticonejo (vector laboratorios, Burlingame, CA, USA), dilución 1:1000 en 0,01 M de PBS ), seguido por la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (vector ABC kit, vector laboratorios, Burlingame, CA, USA) por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Como cromógeno se utilizó diamino-benzidina (DAB, Sigma Aldrich, Argentina) por 5 a 7 min, en una solución conteniendo 0,05% DAB y 0,006% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PB 0,1 M. De este modo el producto final desarrolló una coloración marrón en presencia de marcación y sin coloración en los controles negativos (cortes que no fueron incubados con el anticuerpo primario). Una vez finalizado el revelado se realizaron 3 lavados con PB 0,1 M. Los cortes fueron posteriormente montados en portaobjetos con una solución de gelatina Albrecht (1,5% de gelatina, 80% alcohol) y una vez secos cubiertos con líquido de montaje (DPX, Sigma, Argentina) y cubreobjetos para su visualización.

### *Inmunohistoquímica de Catalasa: recuperación antigénica*

La recuperación antigénica es una etapa necesaria para la realización de inmunoensayos sobre muestras que han estado un tiempo sin ser procesadas desde su obtención, además resulta beneficiosa ya que permite el correcto desenmascaramiento de los epítopes antigénicos. La técnica que se utilizó es la de HIER (heat induced epitope retrieval), la cual se basa en el desenmascaramiento de los epítopes antigénicos a través de la exposición de las secciones histológicas a temperaturas elevadas (80-90 °C). En una primera instancia se precalentó el buffer citrato de sodio 10 Mm (citrato de sodio 0,05% tween 20, pH= 6) en un baño con termostato a 90 °C. Luego se colocó en tubos de vidrio templado con tapa, el buffer en cantidad suficiente y los cortes histológicos. Se dejaron los tubos en el baño durante 10 min. Al finalizar se procedió a enfriar durante 10 minutos bajo agua corriente los tubos tapados y se realizaron 3 lavados de los tejidos con PBS 0,01 M, cada uno de 10 min antes de comenzar el protocolo de inmunohistoquímica.

### *Cuantificación de células positivas para CAT*

Las células CAT positivas fueron identificadas y fotografiadas usando microscopio de campo claro (Leica DM 4000B, Cambridge, UK) con una cámara montada (Leica DFC 300Fx) y el programa de computación IM50 (Leica) con una magnificación de 20x. Se seleccionaron 2 láminas de cada área cerebral y en cada caso se cuantificaron ambos hemisferios (4 campos visuales de cada una de las aéreas seleccionadas) y posteriormente se obtuvo un valor final promedio de estos conteos para cada unidad de experimentación de cuatro animales que fueron cuantificados por grupo experimental. El recuento de células positivas para CAT, se realizó utilizando el programa IMAGE J (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, NIH).

Los grupos experimentales que se utilizaron para el análisis de la expresión de CAT fueron los que se detallan a continuación:

- *Grupo 35d (C y Pb)*: en el cual las crías fueron sacrificadas a los 35 días de edad. Este grupo revela la funcionalidad basal de animales periaolescentes (previo al inicio del esquema de consumo de etanol). En este momento además, los niveles

de Pb aún son detectables en sangre (ver resultados capítulo I) y se presentan en una fase dinámica de movilización a los tejidos blando

- *Grupo 63d ETOH SAL (C y Pb)*: crías sacrificadas al final del consumo de etanol (DPN 63) luego de ser inyectados a diario con solución salina durante una semana. Este grupo refleja las modificaciones producidas por el consumo crónico de ETOH en animales adultos cuyos niveles de Pb en sangre son indetectables, pero en los que el metal se encuentra depositado en tejidos blandos.
- *Grupo 63d ETOH AT (CvsPb)*: crías sacrificadas al final del consumo de etanol luego de ser inyectadas a diario con AT durante una semana. Este grupo refleja el efecto del bloqueo de la enzima CAT sobre el consumo crónico de etanol en animales adultos cuyos niveles de Pb en sangre son indetectables, pero en los que el metal se encuentra depositado en tejidos blandos.
- *Grupo 63d ETOH 3NPA (C y Pb)*: crías sacrificadas al final del consumo de etanol luego de ser inyectadas a diario con 3NPA durante 4 días. Este grupo refleja el efecto de la sobreactivación indirecta de la enzima CAT sobre el consumo crónico de etanol en animales adultos.
- *Grupo 63d noETOH (C y Pb)*: crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de etanol y a las que se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron etanol voluntariamente, y que fueron inyectadas con AT o 3NPA, siguiendo el mismo esquema de administración que los animales sometidos al paradigma de consumo. Este grupo refleja los efectos de los tratamientos en la actividad de la CAT, en animales que no han consumido etanol.
- *Grupo 63d noETOH (C y Pb)*: crías que no fueron sometidas al paradigma de consumo de etanol y a las que se las sacrificó a la misma edad que los animales que consumieron etanol voluntariamente. Este grupo se usó como control de los grupos adultos.

### Análisis estadístico:

El análisis estadístico se efectuó en cada área por separado para facilitar su análisis e interpretación. Se analizó, por una parte el efecto que produce la edad posnatal sobre la expresión de la enzima mediante de un ANOVA de dos vías: grupo (C *vs* Pb) y edad /ETOH (grupos DPN35, DPN63 y DPN63 ETOH/noETOH). Posteriormente, se aplicó un ANOVA de tres vías para evaluar el efecto que produjeron las drogas: grupo x consumo de ETOH x tratamiento y seguido por la prueba de Tuckey cuando esta se correspondía.

### Resultados:

Efecto de la edad posnatal sobre la expresión de CAT: los datos graficados en las figuras 22B) ,23B) ,24B) ,25B) y 26B) corresponden a la expresión de CAT en las diferentes estructuras: corteza, estriado, hipocampo CA1 y CA3 y Nac, las cuales fueron analizadas por separado. Del análisis estadístico en donde se evaluó el efecto que produce la edad posnatal sobre la expresión de la enzima mediante un ANOVA de dos vías se puede observar:

-corteza (figura 22B): el análisis estadístico indica un efecto significativo del factor tratamiento perinatal, grupo (C *vs* Pb):  $F(2,18)=27,55$ ;  $p<0,001$  así como de la edad:  $F(1,18)=34,75$ ;  $p<0,0001$ , y de la interacción entre ambos:  $F(2,18)=34,26$ ;  $p<0,0001$ . El análisis *post hoc* reveló diferencias entre C DPN35 *vs* Pb DPN35 ( $p<0,0001$ ) y a nivel del grupo Pb (DPN35 *vs* DPN63 ETOH/noETOH) tal como puede observarse en la figura 22B).

-estriado (figura 23B): los resultados del ANOVA revelaron un efecto significativo de la variable grupo (C *vs* Pb):  $F(1,18)=22,03$ ;  $p<0,001$ , edad (DPN35, DPN63 ETOH/noETOH):  $F(1,18)=7,38$ ;  $p<0,01$  y de la interacción entre ambas:  $F(2,18)=5,08$ ;  $p<0,02$ . El análisis *post hoc* reveló al igual que lo observado en corteza, diferencias a nivel del grupo Pb (DPN35 *vs* DPN63 ETOH/noETOH) tal como puede observarse en la figura 23B).



-hipocampo CA1 (figura 24B): el análisis estadístico reveló un efecto significativo únicamente de la variable grupo:  $F(1,18)=6,72$ ;  $p<0,02$

-hipocampo ca3 (figura 24B)): el ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del grupo:  $F(1,18)=25,21$ ;  $p<0,0001$  y de la variable edad:  $F(2,175)=6,52$ ;  $p<0,0001$ .

-Nac (figura 26B): se observó un efecto similar al de hipocampo CA3, con una diferencia significativa en la variable grupo:  $F(2,18)=118,45$ ;  $p<0,0001$ , y de la variable edad:  $F(1,18)=70,96$ ;  $p<0,0001$ .

Efecto del tratamiento de AT y 3NPA durante el consumo voluntario de Etoh sobre la expresión de CAT: se realizó un análisis de ANOVA de tres vías separadas cada estructura; las figuras 22A), 23A), 24A), 25A) y 26A) representan la expresión de la enzima luego de los tratamientos con SAL, AT y 3NPA. De los resultados de este análisis se puede observar:

-corteza (figura 22A): el análisis del ANOVA reveló una diferencia significativa para los parámetros droga:  $F(2,36)=29,45$ ;  $p<0,0001$ , grupo x consumo:  $F(1,36)=6,30$ ;  $p<0,02$  y de la interacción entre ambos grupo x droga:  $F(2,36)=3,27$ ;  $p<0,05$ . Además se observó una diferencia significativa de la interacción entre la variable consumo x droga  $F(2,36)=12,85$ ;  $p<0,0001$  así como en la interacción entre grupo x consumo x droga:  $F(2,36)=10,75$ ;  $p<0,0002$ .

-estriado (figura 23A): los resultados del ANOVA demuestran un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,36)=21,43$ ;  $p<0,0001$ , droga:  $F(2,36)=22,19$ ;  $p<0,0001$  y de la interacción entre ambas:  $F(2,36)=10,11$ ;  $p<0,001$ . También se observaron diferencias estadísticas en la interacción grupo x consumo:  $F(1,36)=9,05$ ;  $p<0,005$ , consumo x droga:  $F(2,36)=20,47$ ;  $p<0,0001$  y de la interacción entre grupo x consumo x droga:  $F(2,36)=6,67$ ;  $p<0,005$ .

-hipocampo CA1 (figura 24A): El análisis estadístico reveló un efecto significativo únicamente de la variable droga:  $F(2,36)=15,53$ ;  $p<0,0001$ , de la interacción entre grupo x droga:  $F(2,36)=12,8$ ;  $p<0,0001$  y consumo x droga:  $F(2,36)=5,33$ ;  $p<0,01$ .

-hipocampo CA3 (figura 25A): el ANOVA de tres vías reveló un efecto significativo de consumo:  $F(1,36)=5,61$ ;  $p=0,02$ , de la variable droga:  $F(2,36)=4,14$ ;  $p=0,02$  y de las interacciones grupo x droga:  $F(2,36)=43,09$ ;  $p<0,0001$ , consumo x droga  $F(2,36)=22,89$ ;  $p<0,0001$  y grupo x consumo x droga:  $F(2,36)=6,44$ ;  $p<0,005$ .

-nac (figura 26A): se observó una diferencia significativa en las variables grupo:  $F(1,36)=9,70$ ;  $p<0,005$ , consumo:  $F(1,36)=5,98$ ;  $p<0,02$ , droga:  $F(2,36)=110,71$ ;  $p<0,0001$  y de las interacciones entre grupo x consumo:  $F(2,36)=8,85$ ;  $p<0,05$ , grupo x droga:  $F(2,36)=96,93$ ;  $p<0,0001$ , consumo x droga:  $F(2,36)=112,41$ ;  $p<0,0001$  y grupo x consumo x droga:  $F(2,36)=9,23$ ;  $p<0,02$ .

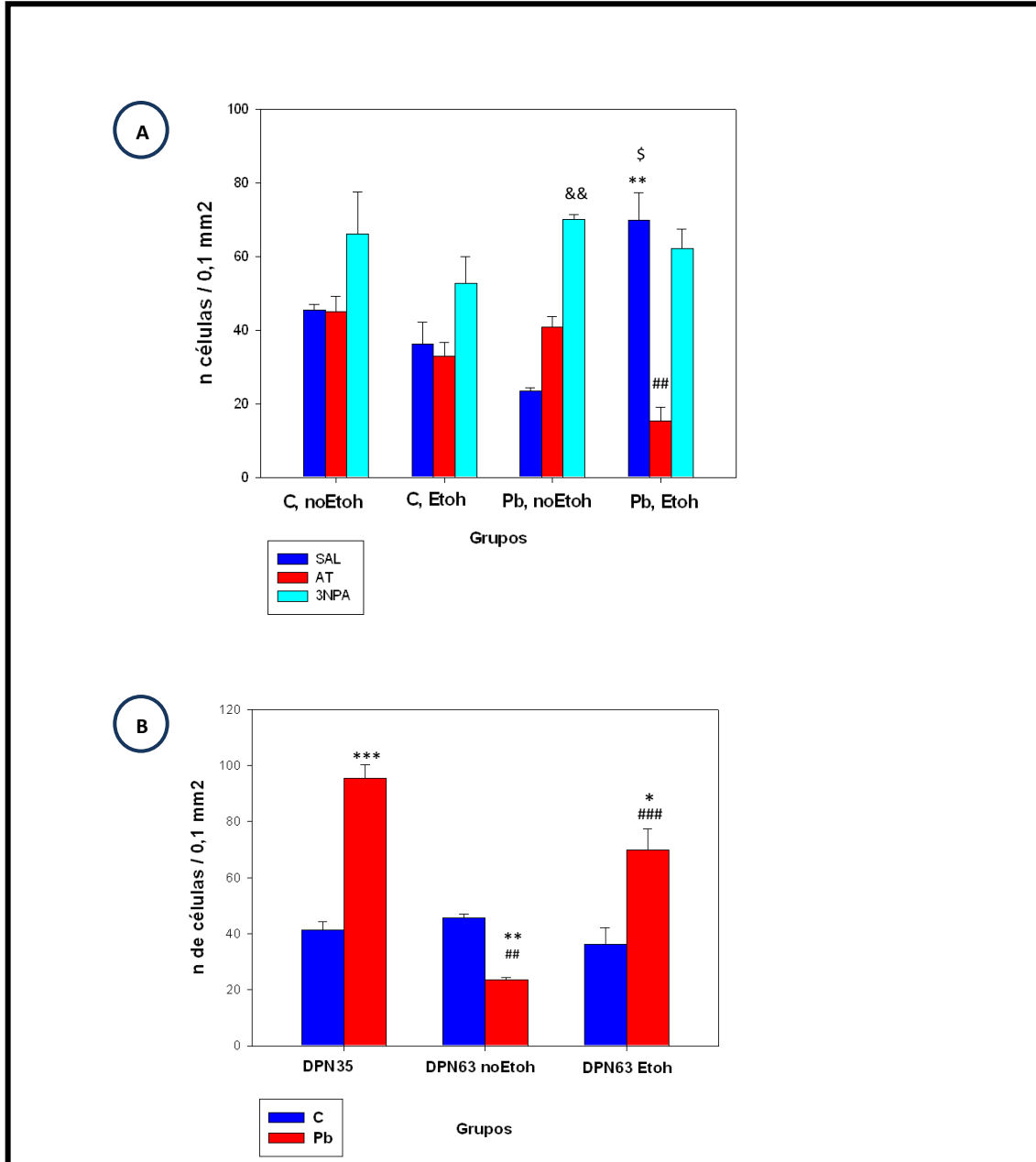


Figura 22: Expresión de CAT en corteza A) efecto del tratamiento de AT y 3NPA sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. \* indica diferencias en comparación con los C de la misma condición (Pb ETOH-SAL vs C ETOH-SAL) a  $p<0,01$ ; # denota

diferencias entre tratamiento con AT dentro del mismo grupo y condición (Pb ETOH-SAL *vs* Pb ETOH-AT) a ##  $p < 0,01$ ; & indica diferencia entre tratamiento con 3NPA dentro del mismo grupo C ETOH-SAL *vs* C ETOH-3NPA a &&  $p < 0,005$  y \$ denota diferencias dentro del mismo grupo de acuerdo a si han consumido o no ETOH (Pb ETOH-SAL *vs* Pb noETOH-SAL) a \$  $p < 0,01$ .

B) efecto de la edad sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. \* indica diferencias en comparación con los C de la misma edad a \*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,001$  y \*  $p < 0,05$ , # denota diferencias entre Pb DPN35 *vs* PbDPN63 noETOH y Pb DPN35 *vs* Pb DPN63 ETOH a ###  $p < 0,0001$  y ##  $p < 0,01$ .

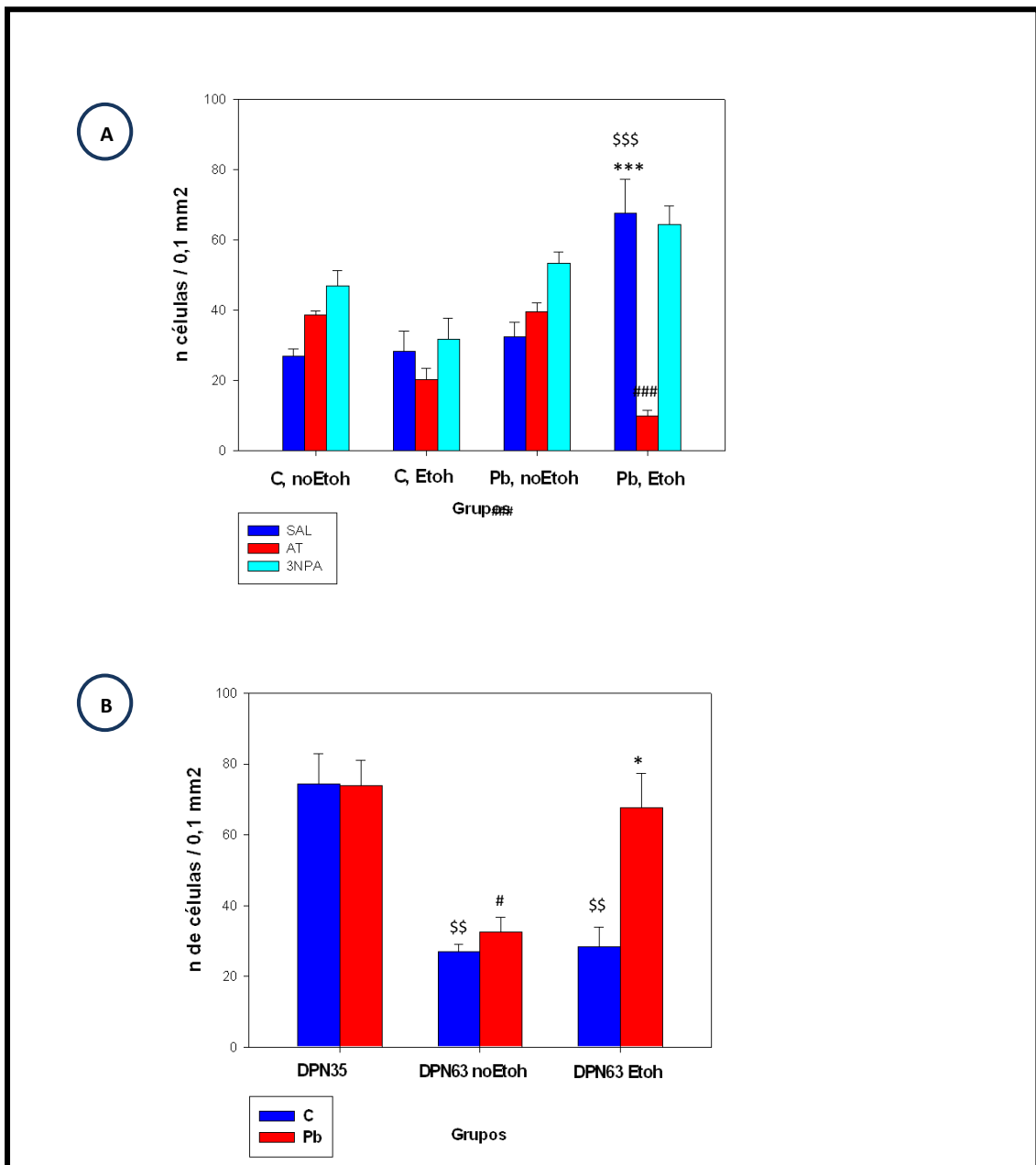


Figura 23: Expresión de CAT en estriado A) efecto del tratamiento de AT y 3NPA sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. \* indica diferencias en comparación

con los C de la misma condición (Pb ETOH-SAL *vs* C ETOH-SAL) a \*\*\* $p < 0,0001$ ; # denota diferencias entre tratamiento con AT dentro del mismo grupo y condición (Pb ETOH-SAL *vs* Pb ETOH-AT) a ###  $p < 0,001$  y \$ denota diferencias dentro del mismo grupo de acuerdo a si han consumido o no ETOH (Pb ETOH-SAL *vs* Pb noETOH-SAL) a \$\$\$  $p < 0,0005$ .

B) efecto de la edad sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. \* indica diferencias en comparación con los C de la misma edad a \*  $p < 0,01$  # denota diferencias entre Pb DPN35 *vs* Pb DPN63 noETOH a #  $p < 0,05$ . Mientras que \$ denota diferencias entre C DPN35 *vs* C DPN63 no ETOH y C DPN35 *vs* C DPN63 ETOH a \$\$  $p < 0,001$ .

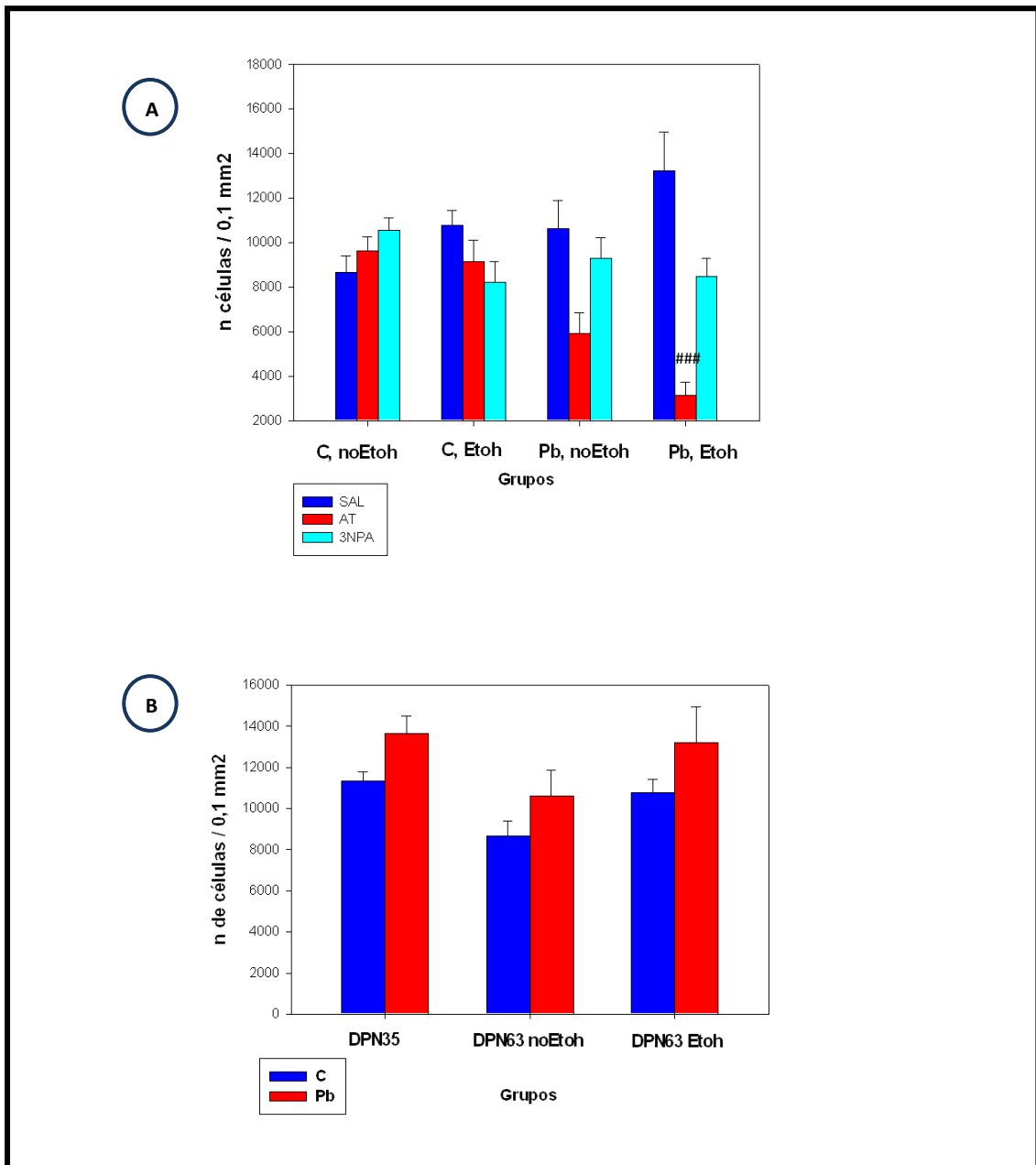


Figura 24: expresión de CAT en CA1 hipocampo. A) efecto del tratamiento de AT y 3NPA sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. # denota diferencias entre tratamiento con AT dentro del mismo grupo y condición (Pb ETOH-SAL vs Pb ETOH-AT) a ### p<0,001.

B) efecto de la edad sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. No se observan diferencias entre los grupos

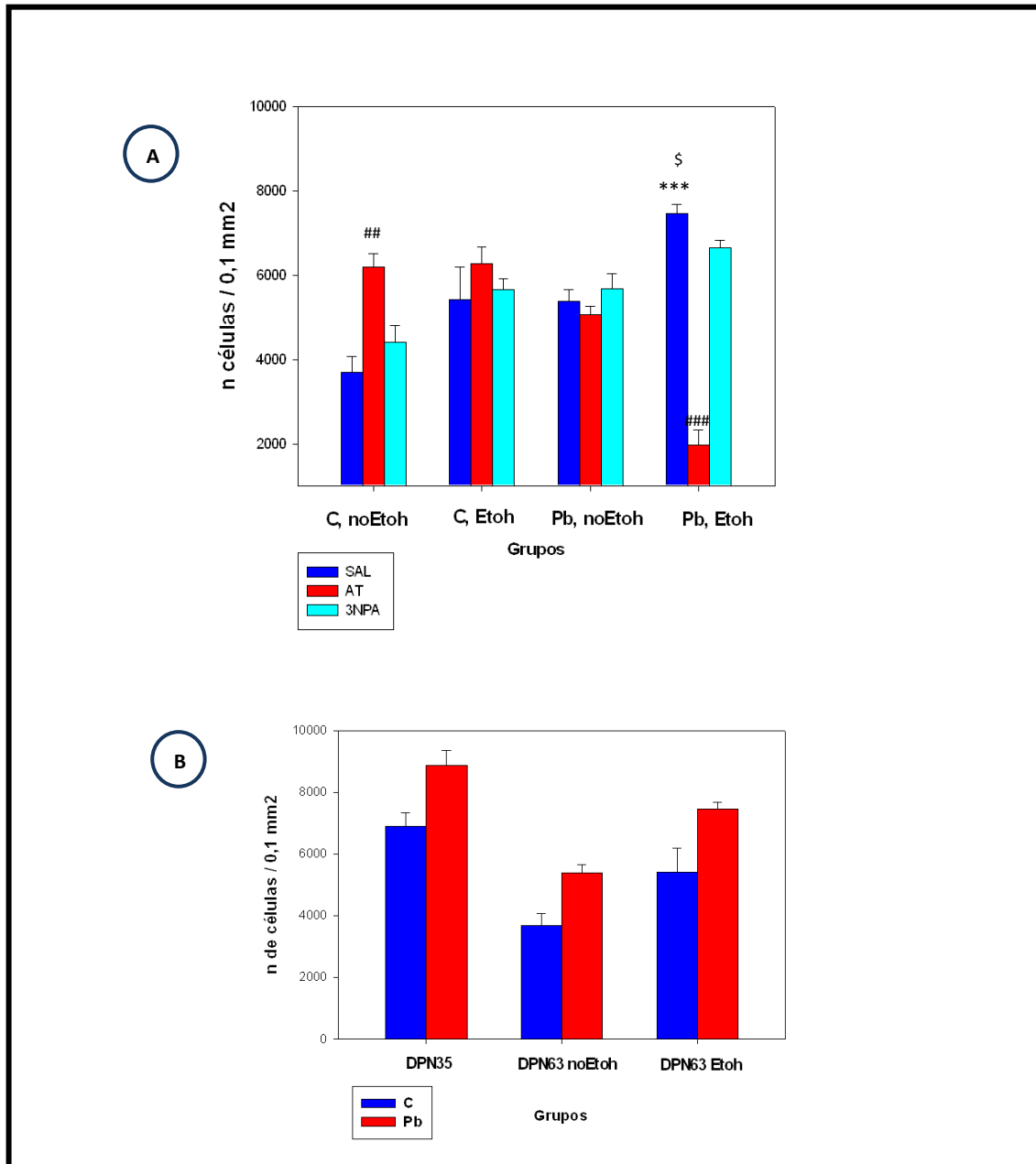


Figura 25: Expresión de CAT en CA3 hipocampo A) efecto del tratamiento de AT y 3NPA sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por 0,1 mm<sup>2</sup>. \* indica diferencias en comparación con los C de la misma condición (Pb ETOH-SAL vs C ETOH-SAL) a

\*\*\* $p < 0,0001$ ; # denota diferencias entre tratamiento con AT dentro del mismo grupo y condición (Pb ETOH-SAL *vs* Pb ETOH-AT) a ###  $p < 0,001$  y (C noETOH-SAL *vs* C noETOH-AT) a ##  $p < 0,002$  y \$ denota diferencias dentro del mismo grupo de acuerdo a si han consumido o no ETOH (Pb ETOH-SAL *vs* Pb noETOH-SAL) a \$  $p < 0,02$ .

B) efecto de la edad sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por  $0,1 \text{ mm}^2$ . No se observan diferencias entre los grupos

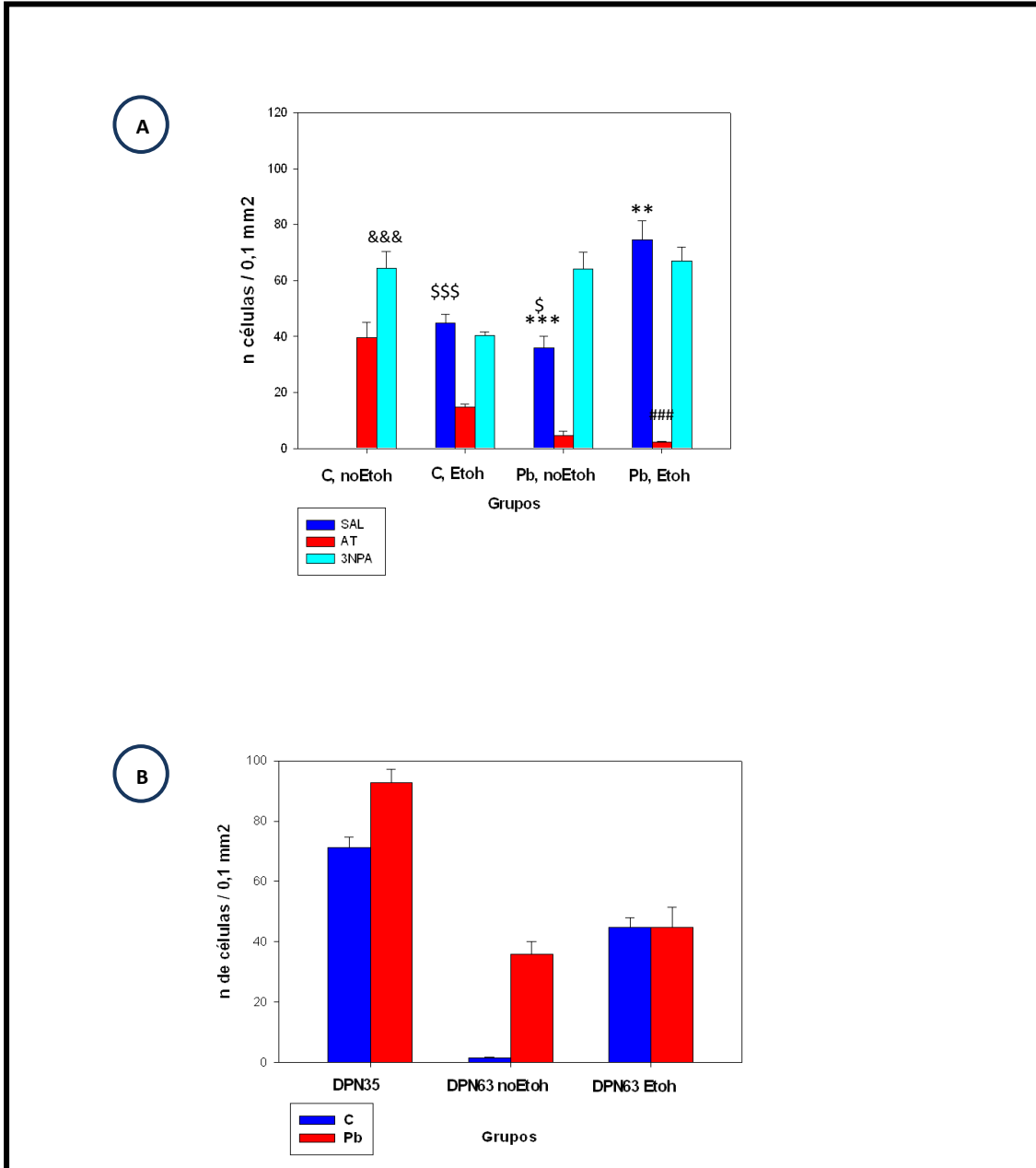
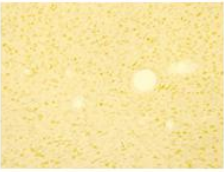


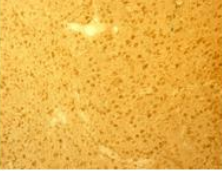



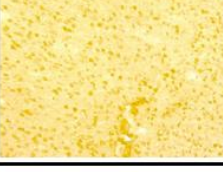


Figura 26: Expresión de CAT en Nac A) efecto del tratamiento de AT y 3NPA sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por  $0,1 \text{ mm}^2$ . \* indica diferencias en comparación con los C de la misma condición Pb ETOH-SAL *vs* C ETOH-SAL a \*\*\* $p < 0,01$  y a \*\* $p < 0,001$  Pb

noETOH-SAL vs C noETOH-SAL; # denota diferencias entre tratamiento con AT dentro del mismo grupo y condición Pb ETOH-SAL vs Pb ETOH-AT a ###  $p < 0,001$ ; y \$ denota diferencias dentro del mismo grupo de acuerdo a si han consumido o no ETOH, Pb ETOH-SAL vs Pb noETOH-SAL / C ETOH-SAL vs C noETOH-SAL a \$\$\$  $p < 0,0001$  y & indica diferencia entre tratamiento con 3NPA dentro del mismo grupo (C noETOH-SAL vs C noETOH-3NPA) a &&&  $p < 0,0001$ .

B) efecto de la edad sobre la expresión de CAT. El número de células positivas fue expresado por  $0,1 \text{ mm}^2$

	C	Pb
DPN35	 $41 \pm 3$	 $95 \pm 4$
DPN63 ETOH SAL	 $36 \pm 6$	 $70 \pm 7$
DPN63 ETOH AT	 $33 \pm 4$	 $15 \pm 4$
DPN63 ETOH 3NPA	 $53 \pm 7$	 $62 \pm 5$







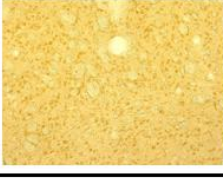



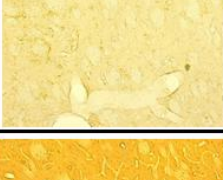



	C	Pb
DPN63 noETOH SAL	 45 ± 2	 23 ± 4
DPN63 noETOH AT	 45 ± 4	 41 ± 3
DPN63 noETOH 3NPA	 66 ± 11	 70 ± 1

Figura 27: Fotografías representativas de inmunohistoquímicas realizadas en corteza para cada uno de los grupos explicados anteriormente.

	C	Pb
DPN35	 74 ± 9	 74 ± 7
DPN63 ETOH SAL	 28 ± 6	 67 ± 9
DPN63 ETOH AT	 20 ± 3	 10 ± 2
DPN63 ETOH 3NPA	 32 ± 10	 65 ± 5




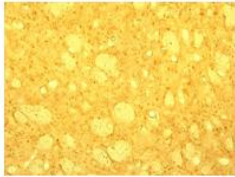





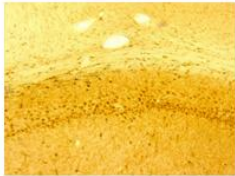






	C		Pb	
DPN63 noETOH SAL		27 ± 2		33 ± 4
DPN63 noETOH AT		39 ± 1		40 ± 2
DPN63 noETOH 3NPA		47 ± 4		53 ± 3

Figura 28: Fotografías representativas de inmunohistoquímicas realizadas en estriado para cada uno de los grupos explicados anteriormente.

	C		Pb	
DPN35		11325 ± 455		13650 ± 864
DPN63 ETOH SAL		10775 ± 651		13200 ± 1763
DPN63 ETOH AT		9150 ± 942		3150 ± 563
DPN63 ETOH 3NPA		8225 ± 906		8450 ± 821


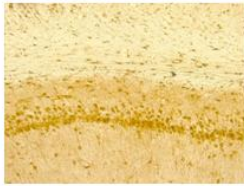

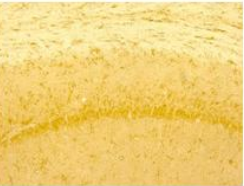



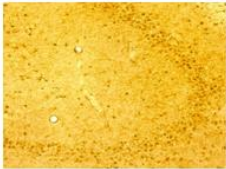






	C	Pb
DPN63 noETOH SAL		
8650 ± 751	10600 ± 1276	
DPN63 noETOH AT		
9625 ± 618	5925 ± 919	
DPN63 noETOH 3NPA		
10550 ± 554	9275 ± 919	

Figura 29: Fotografías representativas de inmunohistoquímicas realizadas en CA1 hipocampo para cada uno de los grupos explicados anteriormente.

	C	Pb
DPN35		
6887 ± 445	8875 ± 478	
DPN63 ETOH SAL		
5412 ± 779	7462 ± 216	
DPN63 ETOH AT		
6275 ± 402	1962 ± 372	
DPN63 ETOH 3NPA		
5660 ± 256	6650 ± 181	








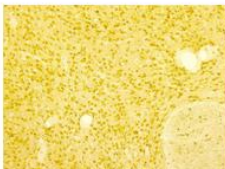

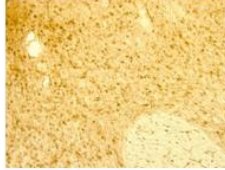
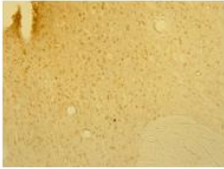



	C	Pb
DPN63 noETOH SAL		
3687 ± 385	5387 ± 275	
DPN63 noETOH AT		
6200 ± 304	5062 ± 206	
DPN63 noETOH 3NPA		
4412 ± 396	5687 ± 339	

Figura 30: Fotografías representativas de inmunohistoquímicas realizadas en CA3 hipocampo para cada uno de los grupos explicados anteriormente.

	C	Pb
DPN35		
71 ± 4	93 ± 4	
DPN63 ETOH SAL		
45 ± 3	42 ± 6	
DPN63 ETOH AT		
15 ± 1	2 ± 0,3	
DPN63 ETOH 3NPA		
40 ± 1	67 ± 5	

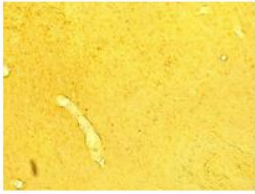
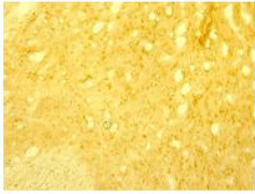
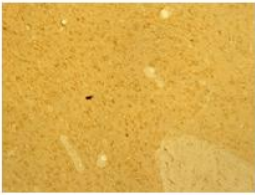



	C		Pb	
DPN63 noETOH SAL		$1,5 \pm 0,2$		$36 \pm 4$
DPN63 noETOH AT		$40 \pm 5$		$4,6 \pm 2$
DPN63 noETOH 3NPA		$64 \pm 6$		$64 \pm 5$

Figura 31: Fotografías representativas de inmunohistoquímicas realizadas en Nac para cada uno de los grupos explicados anteriormente.

		ETOH		noETOH	
C O R T E Z A	Grupo	C	Pb	C	Pb
		DPN35	-	-	41 ± 3
	DPN63 SAL	36 ± 6	70 ± 7	45 ± 2	23 ± 4
	DPN63 AT	33 ± 4	15 ± 4	45 ± 4	41 ± 3
	DPN63 3NPA	53 ± 7	62 ± 5	66 ± 11	70 ± 1
E S T R I A D O	DPN35	-	-	74 ± 9	74 ± 7
	DPN63 SAL	28 ± 6	67 ± 9	27 ± 2	33 ± 4
	DPN63 AT	20 ± 3	10 ± 2	39 ± 1	40 ± 2
	DPN63 3NPA	32 ± 10	65 ± 5	47 ± 4	53 ± 3
H I P O C A 1	DPN35	-	-	11325 ± 455	13650 ± 864
	DPN63 SAL	10775 ± 651	13200 ± 1763	8650 ± 751	10600 ± 1276
	DPN63 AT	9150 ± 942	3150 ± 563	9625 ± 618	5925 ± 919
	DPN63 3NPA	8225 ± 906	8450 ± 821	10550 ± 554	9275 ± 919
H I P O C A 3	DPN35	-	-	6887 ± 445	8875 ± 478
	DPN63 SAL	5412 ± 779	7462 ± 216	3687 ± 385	5387 ± 275
	DPN63 AT	6275 ± 402	1962 ± 372	6200 ± 304	5062 ± 206
	DPN63 3NPA	5660 ± 256	6650 ± 181	4412 ± 396	5687 ± 339

		ETOH		noETOH	
N A C	Grupo	C	Pb	C	Pb
	DPN35	-	-	71 ± 4	93 ± 4
	DPN63	45 ± 3	42 ± 6	1,5 ± 0,2	36 ± 4
	SAL				
	DPN63	15 ± 1	2 ± 0,3	40 ± 5	4,6 ± 2
	AT				
DPN63	40 ± 1	67 ± 5	64 ± 6	64 ± 5	
3NPA					

Tabla 5: número de células CAT positivas en cada una de las áreas seleccionadas ante los distintos tratamientos.

### Discusión:

Los resultados obtenidos proporcionan nuevas evidencias de la participación de CAT en el elevado consumo voluntario de ETOH, en ratas expuestas perinatalmente a Pb. Al respecto, se observó que la expresión de la enzima en concordancia con reportes previos presenta una expresión selectiva en determinadas áreas cerebrales (Zimatkin y cols, 1996; Moreno y cols, 1995), con un patrón diferencial de acuerdo a la edad posnatal y al tratamiento con las diferentes drogas (AT o 3NPA).

En concordancia con reportes previos (Benzi y cols, 1989; Ciriolo y cols, 1997; Houdou y cols, 1991), se observa una disminución de la expresión de CAT con la edad cuando se compararon los grupos que no estuvieron administrados con las drogas. Esta aseveración puede comprobarse cuando se compararon los grupos DPN35 *vs* DPN63 noETOH en estriado (diferencialmente en el grupo Pb), en corteza y Nac (tanto en C como en Pb), se observa una tendencia en hipocampo CA3 y no se evidencia en hipocampo CA1. De manera interesante, en el caso de estriado y corteza únicamente en el grupo Pb que fue sometido al esquema de consumo voluntario esta disminución en la expresión de CAT no se observó en comparación con el grupo Pb de 35 días.

En relación al análisis del efecto del tratamiento con SAL, AT y 3NPA para cada área por separado se puede concluir:

- en todas las áreas excepto hipocampo CA1, se observan diferencias significativas cuando se compara los grupos Pb ETOH-SAL *vs* C ETOH-SAL, observándose un mayor número de células positivas en el grupo expuesto a Pb. Estas diferencias no se observan, cuando se comparan los grupos que no han consumido ETOH (Pb noETOH-SAL *vs* C noETOH-SAL) (excepto en Nac).
- Se observan diferencias significativas en todas las áreas (excepto en CA1) cuando se contrasta los grupos Pb ETOH SAL *vs* Pb noETOH-SAL, evidenciándose una mayor cantidad de células CAT positivas en el grupo expuesto a Pb y sometido al esquema de consumo. Estas diferencias no se observan cuando se compararon sus respectivos controles (C ETOH-SAL *vs* C noETOH-SAL).
- En relación al tratamiento con AT (inhibidor de la enzima,) se observó que tanto en estriado como en corteza en los grupos controles no produjo ningún efecto al comparar tanto los grupos que no consumieron ETOH (C noETOH-SAL *vs* C noETOH-AT) como los que consumieron (C ETOH-SAL *vs* C ETOH-AT). Esto no se observó en Nac en donde en ambos grupos (ETOH/noETOH), se produjo una diferencia significativa evidenciándose una disminución de la expresión en los grupos tratados con AT. En tanto en los grupos expuestos a Pb, se observó (excepto en CA1) una diferencia estadística en los grupos que estuvieron expuestos al esquema de consumo de ETOH (Pb ETOH-SAL *vs* Pb ETOH-AT), observándose nuevamente una drástica disminución en la expresión de células CAT positivas tras el tratamiento con la droga. En tanto en sus contrapartes noETOH expuestas a Pb (Pb noETOH-SAL *vs* Pb noETOH-AT) sólo se observó una diferencia significativa en Nac.
- El tratamiento con 3NPA no produjo un incremento en la expresión de la enzima como se esperaría con excepción del estriado (C ETOH-SAL *vs* C ETOH-3NPA) y Nac (C noETOH-SAL *vs* C noETOH-3NPA Pb noETOH-SAL *vs* Pb noETOH-3NPA).

Como puede evidenciarse los animales expuestos al Pb y sometidos al esquema de consumo voluntario, presentan una mayor cantidad de células CAT positivas lo cual se correlaciona con el mayor consumo de ETOH observado en estos animales. Esto no se observa cuando los animales que no han consumido ETOH. Por otra parte, el tratamiento con AT solo produjo una disminución significativa en el grupo expuesto a

Pb y que consumió ETOH, lo cual se encuentra en concordancia con resultados previos presentados en esta tesis (sección II) y con resultados previos de otro laboratorio (Tampier y cols, 1995) que sugieren que el AT es capaz de inhibir la actividad de la enzima solamente cuando se encuentra en el medio una elevada concentración de  $H_2O_2$ . En cuanto al 3NPA no observamos (en estriado Pb y en C Nac) ningún efecto sobre la expresión de la enzima (excepto en los grupos noETOH).

Teniendo en cuenta que de acuerdo a previos reportes (Zimatkin y cols, 1996; Moreno y cols, 1995), la cantidad de células CAT positivas forman parte de una pequeña porción poblacional neuronal (tanto células neuronales como células gliales), este dato podría explicar la baja actividad que se observa en cerebro total y la baja producción de ACD a partir de ETOH en homogenatos de cerebros (Gaunt y Dave, 1976; Aragón y cols, 1992; Gill y cols, 1992). Además la alta actividad observada en neuronas aminérgicas (en nuestros resultados observada en Nac y en reportes previos en ATV, locus ceruleus y la sustancia nigra pars reticulata) sugiere que la producción de ACD en estas estructuras podría mediar cambios en la actividad del sistema aminérgico. Este sistema aminérgico sobre el cual se hará mayor hincapié en la sección VI constituye un importante y esencial sustrato neuroanatómico para el desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas de abuso. De hecho, la activación de neuronas dopaminérgicas de determinadas áreas como ATV es un fenómeno clave para lograr la activación del sistema de recompensas que involucra la mayoría de las drogas de abuso (Pankseep y cols, 1998; Ikemoto y cols, 2007).

*Como conclusión parcial: CAT presenta una expresión selectiva en determinadas áreas con un patrón diferencial de acuerdo a la edad postnatal, si han consumido o no ETOH y al tratamiento con las diferentes drogas (AT o 3NPA). Los animales expuestos a Pb y sometidos al esquema de consumo voluntario, presentan una mayor cantidad de células CAT positivas lo cual se correlaciona con la actividad de la enzima y con el mayor consumo de ETOH.*



Capítulo III: “*Consecuencias de la microinfusión de vectores lentivirales shRNA anticatalasa en área tegmento*”.

### Capítulo III: “Consecuencias de la microinfusión de vectores lentivirales *shRNA* anticatalasa en área tegmento”.

#### Marco teórico:

##### *Especificidad en la modulación enzimática del metabolismo de ETOH*

Existen en la actualidad ciertos fármacos que se encuentran dirigidos a manipular los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del ETOH y principalmente, debido a su importancia en la generación y eliminación del ACD (Hipólito y cols, 2007). Sin embargo, la mayoría de los fármacos utilizados pueden no sólo actuar sobre la enzima de interés sino también, sobre otras enzimas metabolizadoras de ETOH. Esta última cuestión no hace más que dificultar la interpretación de los resultados y la necesidad de introducir experimentos de control adicionales. Además dificulta la interpretación de resultados la vía de administración empleada, ya que cuando ésta se realiza de forma sistémica, afecta no sólo el metabolismo periférico sino también el metabolismo central del ETOH y como consecuencia de los efectos opuestos que se observan del ACD (reforzantes a nivel central y aversivos a nivel periférico), cuando se analizan conductas asociadas al ETOH no es posible dilucidar cuál efecto es responsable de la misma.

Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de terapias génicas en modelos animales con prometedores enfoques terapéuticos destinados a reducir la ingesta de ETOH en pacientes dependientes, parece de alguna manera abordar las dificultades relacionadas con la especificidad de los fármacos. Mediante la terapia génica, se han utilizando distintas estrategias para transferir genes completos o segmentos de ellos al interior de las células para ser capaces de regular ciertos procesos celulares y enzimáticos (Strachan y cols, 1999). Una de las evidencias más directas de protección génica al desarrollo de una enfermedad como el alcoholismo, es la defensa innata debido a la presencia de una mutación en un solo gen, desarrollada en la población oriental con la presencia de la forma alérgica *ALDH2\*2* (Thomasson y cols, 1991) en la que se basan las terapias dirigidas a la inactivación de *ALDH2*. En estos estudios se utilizan vectores lenti o adenovirales dirigidos a suprimir o incrementar la actividad específica de estas enzimas, ya sea a nivel central o periférico los cuales han demostrado ser capaces de modificar los patrones de ingesta en animales (Ocarranza y cols, 2008; Karahanian y

cols, 2014). Así una sola inyección i.v. de un gen antisentido de ALDH2 transportado por un vector adenoviral, que fue capaz de reducir en un 85% la actividad hepática de la enzima inhibió el consumo voluntario de ETOH en un 50% durante 34 días en ratas dependientes de ETOH (UChB) en comparación con las que no lo eran (Ocarranza y cols, 2008). Mientras que la utilización de un vector lentiviral que produjo un incremento de la actividad de ALDH2 en cerebro en ATV posterior, también redujo el consumo voluntario en ratas *naive* (Karahanian y cols, 2013). Siguiendo la misma línea, la administración de oligonucleótidos antisentidos de fosforotioato, que imitan de alguna manera la baja actividad de la forma alérgica ALDH2\*2 produciendo el incremento de los niveles en sangre de ACD, llevaron también a una aversión por el ETOH (Garver y cols, 2001). En relación a CAT, el único estudio que se ha desarrollado hasta la actualidad utilizando vectores lentivirales ha consistido en inhibir la actividad de la enzima en ATV posterior, con la consecuente reducción del consumo voluntario en ratas que son altas bebedoras de ETOH (Karahanian y cols, 2011).

Consecuentemente, la utilización de estas estrategias genéticas experimentales, que son más específicas para la enzima de interés permiten arribar a conclusiones más certeras que las aproximaciones farmacológicas. De este modo, por ejemplo el uso de terapias que implican la administración cerebral de vectores lentivirales que inhiben específicamente la expresión de CAT cerebral nos permitirá obtener conclusiones más certeras con respecto al posible rol de esta enzima (y del ACD formado localmente a nivel cerebral) sobre los efectos motivacionales del etanol en el modelo de exposición a Pb durante el desarrollo. Por lo tanto, la manipulación genética de CAT a través de los nuevos métodos experimentales de terapia génica podría tener mayores implicancias terapéuticas, al prevenir específicamente el metabolismo central de ETOH sin afectar el metabolismo periférico ni otros sistemas enzimáticos que puedan estar implicados (Karahanian y cols, 2011).

#### *Vectores virales: lentivirus*

La terapia génica es uno de los avances más importantes en los últimos años de la biología y la medicina actual. Consiste básicamente en introducir genes de interés y diseñados con el propósito de corregir o modificar funciones celulares. Los vectores virales fueron uno de las primeras herramientas utilizadas por su alta eficiencia como vehículos de los ácidos nucleicos. Se encuentran compuestos por un ADN o ARN, rodeado por una cápside proteica y en algunos casos por una envoltura lipoproteica. Un

dato de suma importancia reside en el hecho de que, para poder utilizar un virus como vector en terapia génica es importante insertar el ácido nucleico terapéutico en el genoma viral, y conseguir al mismo tiempo que el virus no se replique y por tanto que no sea patogénico. Por esto, los virus utilizados en terapia génica se denominan virus recombinantes y defectivos (carecen de alguna función necesaria para su propio ciclo replicativo) y de esta manera son inocuos para el organismo donde se van a insertar. Para producir estos virus defectuosos, se utilizan líneas celulares (célula empaquetadora, una de las más utilizadas HEK 293T), que poseen los genes virales insertados en el genoma celular, de modo que van a expresar establemente las proteínas virales (figura 32).

Un ejemplo de estos virus, son los retrovirus que pertenecen a la familia *Retroviridae*, dentro de la cual se encuentran los lentivirus siendo el más conocido el del sida (HIV-1). Son virus que contienen como material genético ARN que tienen una envuelta fosfolipídica con glicoproteínas. Dentro de esta envoltura se encuentra una cápside proteica de estructura icosaédrica que contiene 2 copias del genoma viral, la transcriptasa inversa (RT), y la integrasa. El genoma de un retrovirus es una molécula de ARN, que se encuentra compuesta por 3 tipos de genes principales: genes *gag* (que codifican las proteínas de la cápside), genes *pol* (que codifican las enzimas necesarias para el ciclo viral, como la proteasa y la integrasa) y genes *env* (que codifican las glicoproteínas de la envuelta). Una vez que el virus invade la célula huésped, se produce la retrotranscripción para formar un ADNc bicatenario (este proceso tiene lugar dentro de la nucleocápside, antes de su llegada al núcleo de la célula), y después se desensambla la cápside al llegar a la membrana nuclear. El genoma viral se integra en el genoma de la célula huésped (mediante la integrasa del virus), y entonces comienza la transcripción a partir del promotor U3 que está en el LTR izquierdo y se produce un ARNm. Conllevan la dificultad de que sus promotores virales se pueden silenciar por metilación, por lo cual su expresión no es tan prolongada como se requeriría. Luego de ser integrado, el gen terapéutico se expresa utilizando las enzimas de la célula huésped (Eglitis y cols, 1985).

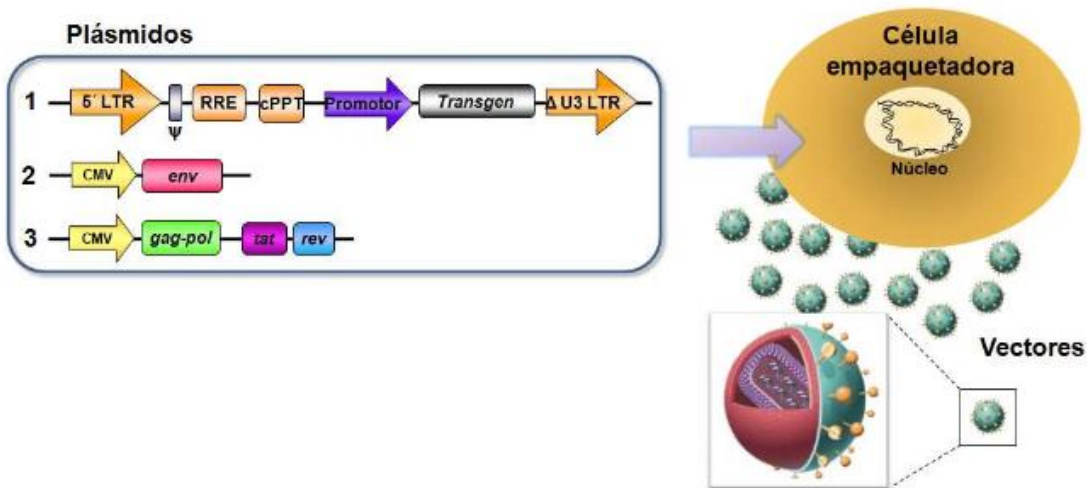


Figura 32: Sistema de generación de vectores lentivirales, extraído de Romero García y cols (2009). La producción de los lentivirus se produce por la transfección de 3 plásmidos en la célula empaquetadora: 1) plásmido vector, con el ARN genómico en el cual los genes virales han sido eliminados y se ha sustituido en su lugar el gen de interés y su promotor; 2) plásmido de envoltura (*env*) para la cubierta del virus y fusión de la célula diana; 3) plásmido empaquetador (*gag-pol*) con genes *gag* que permiten el empaquetamiento del ARN genómico en la partícula viral y *pol* necesario para la transcripción en reverso e integración al genoma celular.

### *Silenciamiento génico postranscripcional*

La inhibición de la expresión de un gen en animales, se logra a través de la construcción de un gen que sintetice en la célula un ARN que se pliegue sobre sí mismo para formar una estructura en forma de horquilla (el tallo lo constituye el ARN de doble hebra). Esta horquilla, sintetizada por la ARN polimerasa III bajo el control del promotor ARN U6 humano, expresa un ARN carente de Cap (caperuza) y poli A-ambas protegen contra la degradación de ARNasas, produciendo una molécula muy similar a un ARN de doble hélice que puede ser sustrato de Dicer (ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasa III) y liberar un siARN o shARN. El mecanismo por el cual se produce el silenciamiento es el siguiente: 1) se inicia con la introducción a las células de un ARN de doble cadena, bien sea, naturalmente por un evento de transposición por un virus, por la producción a nivel celular de microARNs endógenos, o por distintos procedimientos experimentales; 2) el ARN de doble hebra es procesado por la enzima Dicer liberando ARN de doble hebra de 21-23 pb (pares de bases); 3) estos ARN pequeños son incorporados al complejo de silenciamiento *RISC* (*RNA induced silencing complex*) que al activarse se ensambla y presenta una actividad similar a

una helicasa asignada al complejo, desenrolla la doble hélice del siARN quedándose con la hebra antisentido o guía, la maquinaria de RISC activa reconoce a los ARN mensajeros que contiene la secuencia complementaria perfecta o casi perfecta, para guiar el corte preciso del mRNA en una posición complementaria al nucleótido 10 (pb 10) de la hebra guía cuando se cuentan los nucleótidos a partir del extremo 5', e impidiendo que se traduzca dicho mRNA (Correa de Adjounian y cols, 2007) (figura 33).

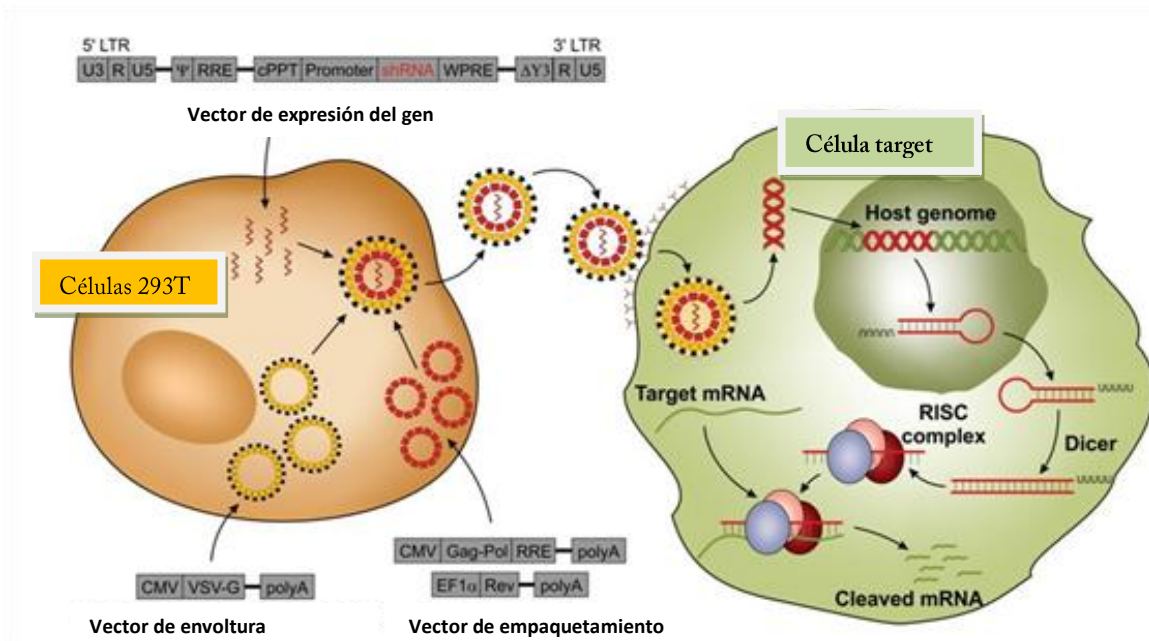


Figura 33: Utilización de vectores lentivirales para la producción de shRNA y silenciamiento génico postranscripcional, modificado de Balasthy y cols (2011).

### *Circuito de motivación y recompensa: circuito mesocorticolímbico y área tegmental ventral*

Un hallazgo importante relacionado a la adicción a drogas como cocaína, ETOH y anfetaminas ha sido poder relacionar las propiedades euforizantes de estas sustancias con mecanismos celulares y moleculares en los que participan estructuras neurales del SNC (Vetulani, y cols, 2001). El concepto de recompensa, estaría relacionado con las consecuencias y sensaciones subjetivas experimentadas como positivas y placenteras producidas por la estimulación de los denominados centros de placer existentes en el SNC, y que llevarían a repetir determinadas acciones. A partir de los años 60, los estudios de autoadministración demostraron que todas las drogas eran capaces de actuar como reforzadores positivos, lo cual representó una importante evidencia de que estas

actúan sobre un sistema de recompensa neuroanatómico especializado que es común con los reforzadores naturales como alimento y sexo entre otros y que cumple un papel esencial en los procesos cognitivos, de refuerzo y motivación (Tomkins y cols, 2001). El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico situado en la parte anterior del cerebro constituye este sustrato neuroanatómico esencial para el desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas de abuso (Koob y cols, 2006). Está conformado por una serie de núcleos interconectados entre sí, principalmente por los cuerpos neuronales localizados en el ATV con axones que proyectan hacia el Nac, que producen la liberación de dopamina, tal como se muestra en la figura 34. Se ha demostrado que en las primeras fases de la adicción se produce una importante estimulación de las neuronas dopaminérgicas y una acumulación de dopamina predominantemente en el Nac (Koob y Bloom, 1988; Wise y Bozarth, 1987). De ahí la concepción que sostiene que la adicción a drogas, puede ser considerada como una enfermedad que involucra el sistema de recompensa cerebral (Vetulani y cols, 2001). Las sustancias de abuso por lo tanto, son capaces de modular este circuito, que es fundamental en el inicio y mantenimiento de comportamientos importantes para la supervivencia tales como alimentarse o la actividad sexual.

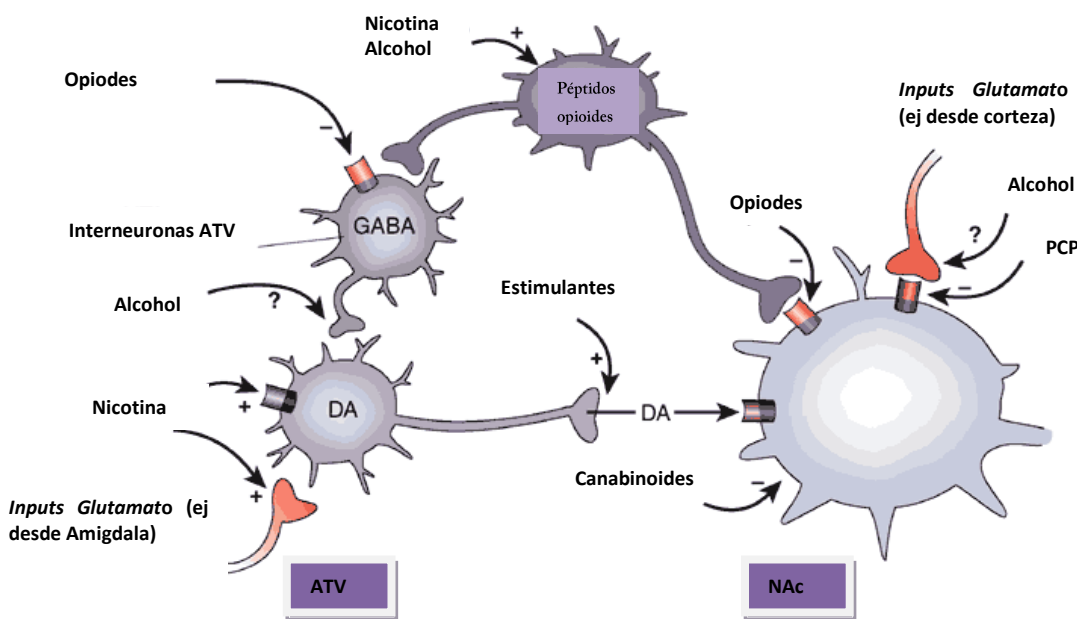


Figura 34: Circuito mesocorticolímbico, representado principalmente por ATV y Nac con la consecuente liberación de dopamina en Nac, modificado de Nestler y cols (2005).

El ATV, dentro de este circuito de motivación recibe particular interés. Se trata de una región del cerebro en donde se efectúa el procesamiento tanto de la información sensorial y emocional saliente, controlando comportamientos relacionados con la motivación, la recompensa natural y relacionada con las drogas, también la recompensa relacionada con el aprendizaje, el estado de ánimo, y participación de las patologías asociadas (Nestler y Carlezon, 2006; Campos y cols, 2007; Gacia y cols, 2007; Bromberg-Martin y cols, 2010; Hong y cols, 2013; Ikemoto y Bonci, 2014). Existen evidencias a nivel neuroanatómico que señalan que más allá de una heterogeneidad celular, se encuentra un gradiente entre la zona antero-posterior (ATV anterior y ATV posterior), que condiciona conductas tales como actividad locomotora, condicionamiento asociado a un sitio, autoadministración, en respuesta no sólo al ETOH sino también el ACD como así también a otras drogas incluyendo opioides, cocaína y nicotina (Ikemoto y cols, 2007). Es importante destacar, que si bien las evidencias indican que las proyecciones enviadas de ATV posterior hacia Nac Shell son las más importantes en los fenómenos de reforzamiento, no son las únicas si bien todo indicaría que son las principales (Carlezon y cols, 1996).

Así, las subdivisiones del ATV se han definido en base a consideraciones neuroanatómicas y funcionales. Las primeras divisiones, tuvieron en cuenta la heterogeneidad morfológica más que la funcional. Estudios publicados en el año 1979 (Phillipson y cols, 1979a, b, c) utilizando tinción de Golgi dividieron el ATV en cinco núcleos; dos núcleos laterales: núcleo paranigral (PN) y el núcleo pigmentoso parabranchial (PBP) y tres núcleos mediales: interfascicular (IF), el de la línea rostral (Rli) y los núcleos de la línea caudal (Cli). En la actualidad se han propuesto cuatro zonas principales: los tradicionales PN y PBP y dos más que incluyen al área adyacente al parafascículo reflexo (PFR) y la cola del tegmento ventral (tATV), (en la figura 35 se puede observar la localización y posición relativa de estas zonas) (Ikemoto y cols, 2007; Sanchez Catalán y cols, 2012). Tanto la PBP como el PN son zonas ricas en cuerpos neuronales dopaminérgicos, mientras que tATV y PFR presentan un contenido inferior en células dopaminérgicas. Este último dato es importante pues, aunque el ATV ha sido considerado clásicamente como una región eminentemente dopaminérgica, la realidad es que en la rata algo menos del 60 % de subpoblación neuronal es dopaminérgica (Swanson y cols, 1982; Margolis y cols, 2006b). A pesar de que en los últimos trabajos se ha logrado obtener una subdivisión más certera con respecto a la existencia de



diferencias anatómicas del ATV, el abordaje de sus respectivas funciones resulta difícil de estudiar, seguramente debido a la dificultad de manipular selectivamente estos grupos de células, como consecuencia de su pequeño tamaño, su proximidad y en que en su mayoría comparten sustratos neuroquímicos (Sanchez- Catalán y cols, 2012).

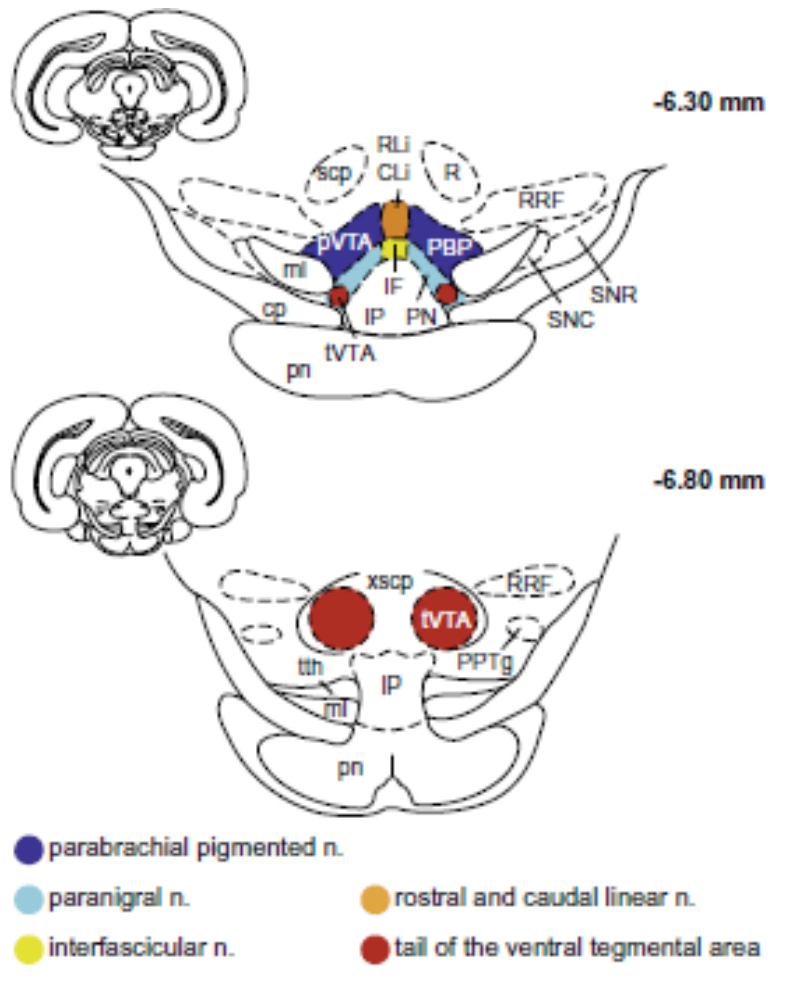


Figura 35: Esquema de organización neuroanatómica de ATV en ratas, en donde se encuentran representados los 5 núcleos principales, extraído de Sanchez-Catalán (2014).

*Teniendo en cuenta el doble papel de la CAT como un antioxidante y componente clave de la oxidación cerebral de ETOH, en el presente estudio se pretende evaluar los efectos de la inactivación CAT en el ATV sobre la ingesta de ETOH en un paradigma de libre elección ETOH/agua. Por lo tanto, esperamos que la administración de un vector lentiviral antiCAT en áreas críticas para procesos de recompensantes disminuya el consumo voluntario de ETOH en estos animales, lo cual proporcionaría una evidencia adicional sobre el papel de CAT (y ACD central) en las conductas inducidas por ETOH.*

En base a lo expuesto anteriormente el OBJETIVO de este capítulo fue determinar si el silenciamiento del gen que codifica para CAT en el ATV reduce el elevado consumo de ETOH tal como hemos reportado en secciones anteriores (mediante la inhibición farmacológica de la enzima con AT). Para ello, un vector lentiviral shRNA antiCAT fue microinfundido previo a la fase de adquisición del consumo de ETOH o una vez que éste estuvo estabilizado cuando los niveles de ingesta de la droga fueron mayores en los animales expuestos a Pb. Como sitio de administración se seleccionó ATV posterior, área cerebral relacionada con las propiedades recompensantes y motivacionales de las drogas incluyendo a ETOH.

## Materiales y Métodos:

### *Generación de vectores lentivirales antiCAT*

La construcción del vector lentiviral se realizó de acuerdo a procedimientos publicados por Karahanian y cols, 2011. Específicamente, el vector lentiviral de rata que tiene como “*target*” el shARN de CAT (ARN de transferencia) fue impulsado por el promotor humano (ARNi Consortium, Broad Institute of MIT y Harvard TRCN0000120679) y empaquetado por un sistema “*lentivector packing*” (System Biosciences, Mountain View, CA) en células HEK293T, de acuerdo al protocolo provisto por el vendedor. Los vectores controles virales fueron generados a partir de los mismos vectores pero en ausencia de la secuencia shARN.

### *Plásmidos*

Los plásmidos utilizados para este experimento fueron:

- **pshARN antiCAT plko.1** (The RNAi Consortium, Broad Institute of MIT and Harvard TRCN0000120679) que contiene el ARN que codifica para el DNA de interés (gen de silenciamiento para la expresión de la proteína CAT) para la generación del vector lentiviral.
- **pcatalasa pexpress** que codifica para el control positivo del DNA de interés.

- **pPVSV-G y pdelta8, 9** plásmidos que contienen los genes de envoltura y los genes gap, pol y rev necesarios para la correcta generación e incorporación al organismo de los vectores lentivirales (cápside protectora, maquinaria de síntesis, etc.).

### *Plásmidos: identificación y confirmación*

El método que se describe a continuación es, por su simplicidad, uno de los más utilizados para transformar *E. coli*. La transformación es una técnica rutinaria de enorme utilidad, que nos permite introducir prácticamente cualquier plásmido en su forma circular o superenrollada en casi cualquier tipo de bacteria. Para detectar la transformación, el ARN introducido llevará un marcador seleccionable en el medio adecuado.

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , a las cuales se las convirtió en quimiocompetentes mediante el uso de un medio con NaCl, para facilitar su transformación con los plásmidos de interés mediante choque térmico (calor/frío) y posterior recuperación. Como marcador para identificar la introducción del plásmido de interés en las bacterias, se confirió la resistencia a ampicilina. Por lo que posterior a su recuperación se procedió a plaquearlas en un medio de cultivo con agar y ampicilina para poder seleccionarlas. Se aisló un clon de una colonia que creció en las placas y se empleó un método de “lisis alcalina” para la obtención y purificación del plásmido de interés. Este método se basa en la desnaturalización y precipitación selectiva del ADN cromosómico en medios con NaOH y SDS. En estas condiciones el ADN plasmídico permanece intacto debido principalmente a su pequeño tamaño y a su naturaleza circular y superenrollada. El tratamiento con alta concentración de sal (acetato potásico) y SDS produce la precipitación de gran parte de las proteínas. El tratamiento con RNasa elimina la contaminación de ARN que puede ser importante. La purificación del ADN plasmídico se completa entonces por precipitación con ETOH absoluto. Luego de esto se procedió a la identificación y la confirmación del plásmido cortándolo con enzimas de restricción adecuadas para cada uno de ellos y su posterior visualización en una electroforesis en un gel de agarosa.

Las enzimas de restricción que se utilizaron para cada uno de los plásmidos fueron las siguientes:

– **pshRNAantiCAT plko.1:** HindIII, SpeI y EcoRI

- **pdelta8, 9:** EcoRI e HindIII
- **pCAT pexpress:** EcoRI e HindIII
- **pPVSV-G:** BstB I, SacI y EcoRI

### *Cultivos de células embrionarias humanas de riñón HEK293T*

Se utilizaron cultivos de células HEK293T (ATCC CRL-1573) para construir los vectores lentivirales. Se cultivaron las células HEK293T en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementado con 3,7 g/L de NaHCO<sub>3</sub> más penicilina 100 U/ml y estreptomycin 0,1 mg/ml y 10% de suero fetal de bovino caracterizado y esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, EE.UU.) en placa de 35 mm (Falcon® Becton Dickinson Labware ó Corning®). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub> (Indura, Santiago, Chile) y 95% aire en un incubador Napco 6101F-1 (Chicago, IL, EE.UU.). Las células se mantuvieron subconfluentes realizando trasposos según se necesitara, a continuación se extrajo la totalidad del medio de cultivo, se les agregó 1 ml de Tripsina-EDTA 1X (Gibco™. Gand Island, NY, EE.UU.) y luego de 2 min a 37 °C se le agregó 3 ml de DMEM con suero para neutralizar la enzima. Las células se resuspendieron y se sembró 1/10 del volumen en las placas en un medio de cultivo fresco con suero.

### *Transfección de células HEK293T con pCAT*

Las células HEK293T se seleccionaron, debido a su gran capacidad para incorporar ácidos nucleicos formando complejo con lipofectamina. Estas células se transfectaron con el plásmido pCAT que codifica para la expresión de la enzima CAT (control positivo).

El proceso de transfección comenzó con la tripsinación de las células HEK293T, que se contaron en una cámara de Neubauer (HBG. Giessen-Luetzellinden, Alemania) y sembraron a razón de  $1,2 \times 10^6$  células por placa de 35 mm (Falcon® Becton Dickinson Labware ó Corning®) con 2 ml de medio DMEM con suero y sin antibiótico y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h una vez que las células alcanzaron una confluencia del 70-80%, se reemplazó el medio de cultivo por 1 ml de DMEM sin suero y sin antibiótico, luego de 20 min en el incubador necesario para equilibrar el medio y se

transfectaron con el complejo lipofectamina 2000-ácido nucleico. Para transfectar una placa de 35 mm se diluyó en 250 µl de DMEM sin suero y sin antibiótico 2 µg y 3 µg del plásmido pCAT. La dilución se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Mientras tanto se diluyó en un tubo aparte 5 µl de lipofectamina 2000 en 245 µl de DMEM sin suero y sin antibiótico, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones (ADN y lipofectamina 2000) y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 10 min. El complejo de ADN-lipofectamina se adicionó gota a gota a las células en cultivo. Las células se incubaron durante 6 h, en un volumen de 1,5 ml en ausencia de suero. Finalmente se cambió el medio de transfección por 2 ml de DMEM con suero, y se continuó el cultivo de las células a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% por otras 48 h. En ese momento las células se cosecharon con polietilenglicol y NaCl, y se las dejó en un balancín a 4 °C durante la noche. Al día siguiente las células fueron lisadas y resuspendidas en PBS y medida en ellas la actividad de CAT mediante un kit (Catalase ActivityColorimetric/Fluorometric Assay Kit Highly sensitive Assay de Biovision) para determinar si las células fueron transfectadas con el plásmido. El procedimiento puede observarse en la figura 36.

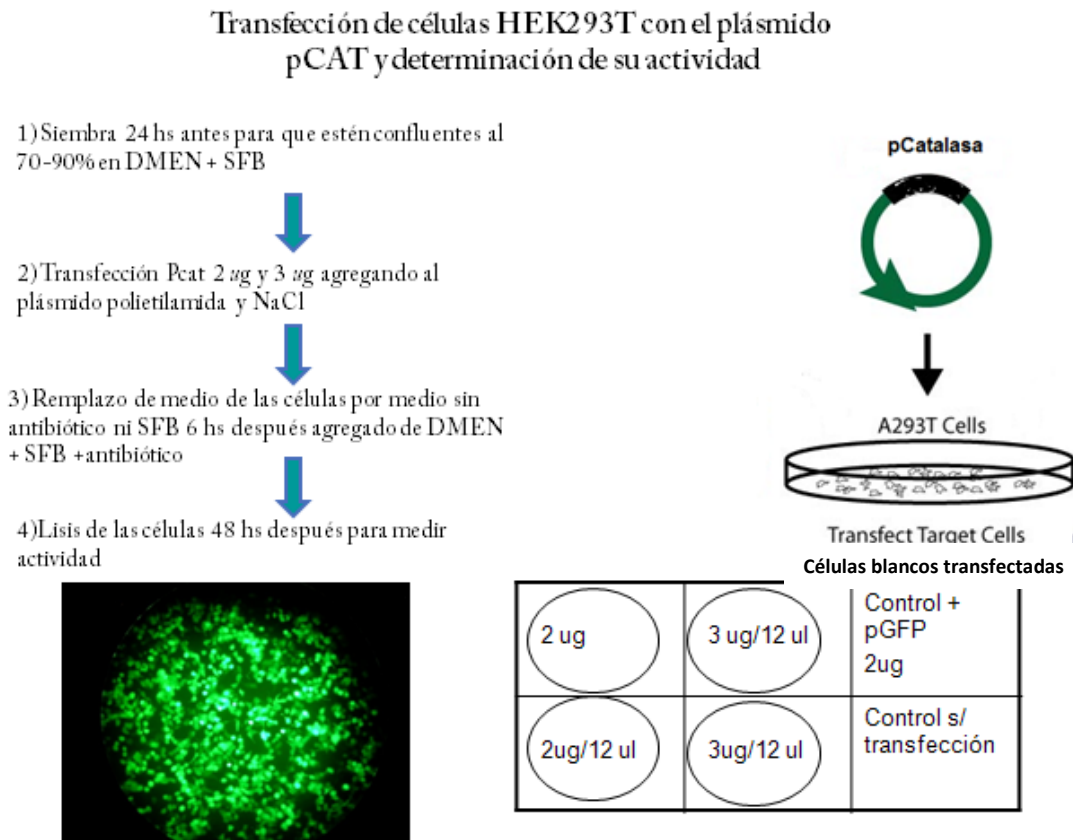


Figura 36: proceso de transfección de células HEK293T con el plásmido pCAT.

### Generación de lentivirus: Transfección de células HEK293T con los plásmidos pshRNAantiCAT, pVSVG y pdelta 8,9

Tal como se observa en la figura 37 se procedió a transfectar las células siguiendo el mismo procedimiento que con el vector pCAT, pero en su lugar las células fueron transfectadas con pshRNAanticat plko.1, pdelta 8, 9 y pPVSV. Los vectores obtenidos fueron resuspendidos en PBS y guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

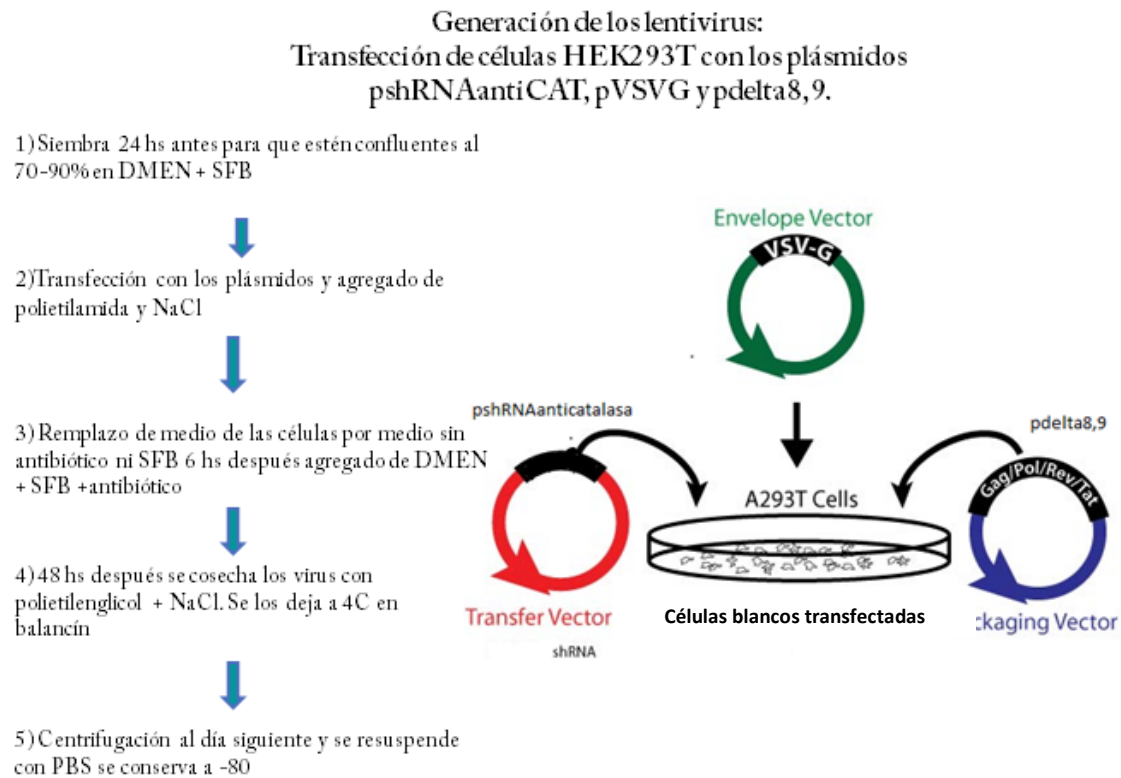


Figura 37: proceso de generación de lentivirus con los plásmidos correspondientes.

### Titulación de los vectores

Para determinar el título de los vectores (unidades de transducción por ml) se sembraron  $10^5$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente se añadieron 1 y 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones a titular. Las células incubadas con las diferentes muestras de vectores se dejaron crecer al menos una semana y se procedió a la obtención de ADN y a la cuantificación del número de copias del vector integrado en cada muestra. Para ello se realizó una q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) incluyendo una curva estándar de plásmido con cantidades seriadas del mismo. A partir de esta curva estándar se interpoló el número de copias correspondiente a cada

muestra. Este valor indica las partículas virales eficientes para transducción presentes en el volumen utilizado inicialmente (1 ó 10  $\mu\text{l}$ ). Para calcular el título (número de partículas eficientes por cada mililitro) se multiplicó por 1000 o 100 en función del volumen utilizado inicialmente.

#### *Administración intracerebral en ATV con vectores lentivirales*

Antes de iniciar el esquema de consumo voluntario de ETOH (DPN 32), los animales fueron microinfundidos con un inyector en ATV posterior, con el vector lentiviral (en PBP) o con el vector vacío control, de acuerdo a las coordenadas obtenidas del Atlas de Paxinos (2009): AP-5.2; ML-0.8; DV-7.2. Los inyectores se conectaron a una microjeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) de 10  $\mu\text{l}$  vía un catéter de polietileno (P10, Becton Dickinson, MD, USA). Específicamente, las partículas virales ( $2,34 \times 10^4$   $\mu\text{l}$  de virus) estuvieron contenidas en un volumen de 0,5  $\mu\text{l}$  de shARN antiCAT y fueron infundidas a una velocidad de 0,329  $\mu\text{l}/\text{min}$  con una bomba de infusión (MasterFlex pump, Modelo 77200-20). Una vez introducido el inyector, se esperó 1 min, luego se infundió la solución durante 1 min y 52 seg y el inyector fue dejado en su lugar por 5 min más para evitar el reflujo de la solución y permitir su lenta difusión por el tejido.

Los animales operados durante el DPN32 fueron hospedados de a pares para evitar el estrés del aislamiento, como se explicó anteriormente cada caja fue considerada como una unidad experimental. Se les permitió una recuperación de 2 días antes del inicio del esquema de consumo voluntario de concentraciones crecientes de ETOH (4 días al 2%, 4 días al 4%, 4 días al 6%, 4 días al 8%, y 12 días al 10% v/v en sesiones diarias de 2 horas). Cabe destacar que otro grupo de animales de la misma edad fueron microinyectado al mismo tiempo con el vector viral control (vector vacío) y sometidos al esquema de consumo de ETOH.

Otro grupo separado de animales, fueron operados el día 21 de consumo (DPN56) una vez que las diferencias entre grupos en el consumo de etanol al 10 % emergieron y la ingesta se mostró estable. Se empleó un procedimiento similar al explicado anteriormente con ligeras diferencias en el volumen y en el número de partículas infundidas, así como en el tiempo de infusión:  $4,68 \times 10^4$   $\mu\text{l}$  partículas de virus en un volumen de 1  $\mu\text{l}$  de shARN antiCAT durante 3 min y 3 seg. Posteriormente se registró el consumo de ETOH durante 12 días adicionales para evaluar el impacto de la inhibición de la expresión de la enzima sobre esta conducta (debido al tiempo que se

requiere para que el vector ejerza su efecto sobre la expresión de CAT). Asimismo, otro grupo de animales fue microinfundido con el vector control en el día 21 de consumo siguiendo el mismo protocolo empleado para los animales descriptos anteriormente.

En todos los casos, al finalizar el esquema de consumo de ETOH los animales fueron sacrificados. Cabe destacar que puesto que se administró el vector lentiviral en el hemisferio derecho, sólo se utiliza este lado para efectuar la determinación de la expresión de CAT. En la figura 38 se puede observar el esquema utilizado.

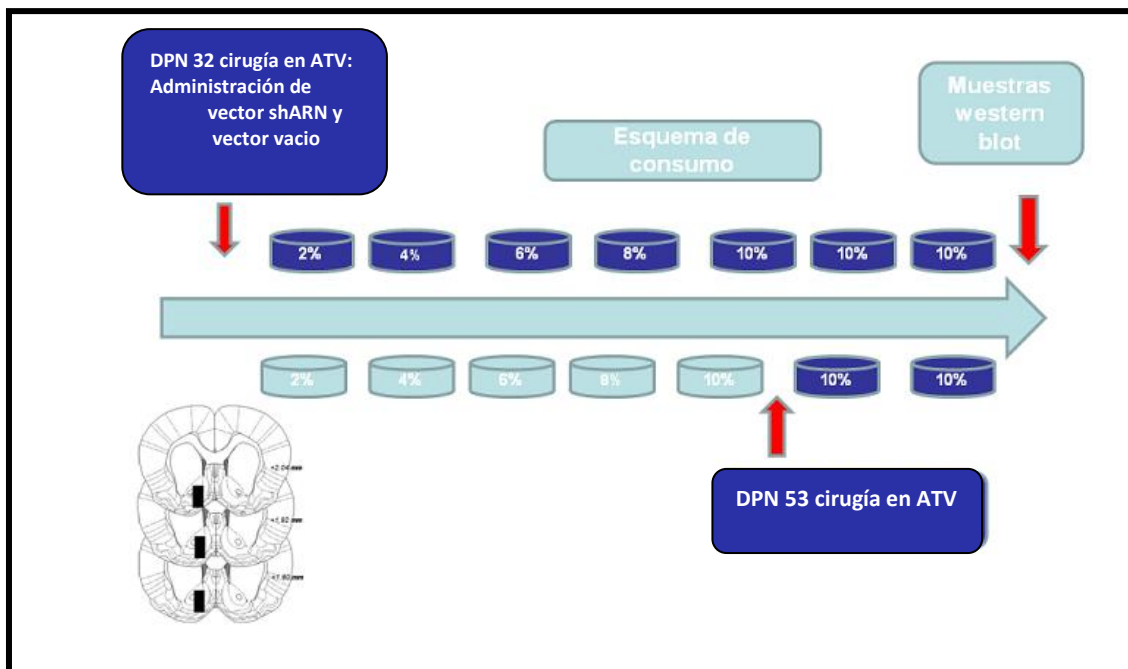


Figura 38: Esquema de administración en ATV de los vectores lentivirales en los distintos grupos en animales sometidos al consumo de ETOH.

### Análisis estadístico:

En los experimentos en los cuales el vector lentiviral fue administrado previo al esquema del consumo voluntario el registro de la ingesta de ETOH (en g/kg y % preferencia ETOH/agua) fue compactado en bloques de 4 días y analizado mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas comparando las variables grupo, tratamiento y concentración de ETOH/tiempo como la variable repetida. Por otro lado, cuando el vector lentiviral fue administrado en el día 21 del esquema de consumo de ETOH (DPN56) se aplicó un ANOVA de dos vías medidas repetidas, contrastando la variable grupo frente a la concentración de ETOH/tiempo previa a la administración del vector



y luego con la administración del mismo un ANOVA de tres vías de medidas repetidas comparando las variables grupo, tratamiento y concentración de ETOH/tiempo como la variable repetida. En todos los casos, cuando se encontró una interacción significativa, se realizó una prueba de Tuckey, con el resultado de los valores de  $p$  indicados en las leyendas de las figuras.

## Resultados:

### *Titulación de los vectores virales*

Se procedió a la titulación de los lentivirus producidos, siguiendo el procedimiento detallado en la sección anterior mediante la técnica de q-PCR. Los resultados obtenidos son los que se detallan a continuación:

-Título Lentivirus shRNA antiCAT (muestra número 1):  $100 \times 4,68 \times 10^7$  IU/ml =  $4,68 \times 10^9$  IU/ml

-Título Lentivirus shRNA antiCAT (muestra número 2):  $100 \times 2,56 \times 10^6$  IU/ml =  $2,56 \times 10^8$  IU/ml

Título Lentivirus control (muestra número 1):  $100 \times 2,36 \times 10^7$  IU/ml =  $2,36 \times 10^9$  IU/ml

### *Identificación y confirmación de los plásmidos*

Los plásmidos fueron identificados y confirmados mediante un análisis con enzimas de restricción por electroforesis de agarosa. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

*Identificación de pVSVG mediante enzimas de restricción*

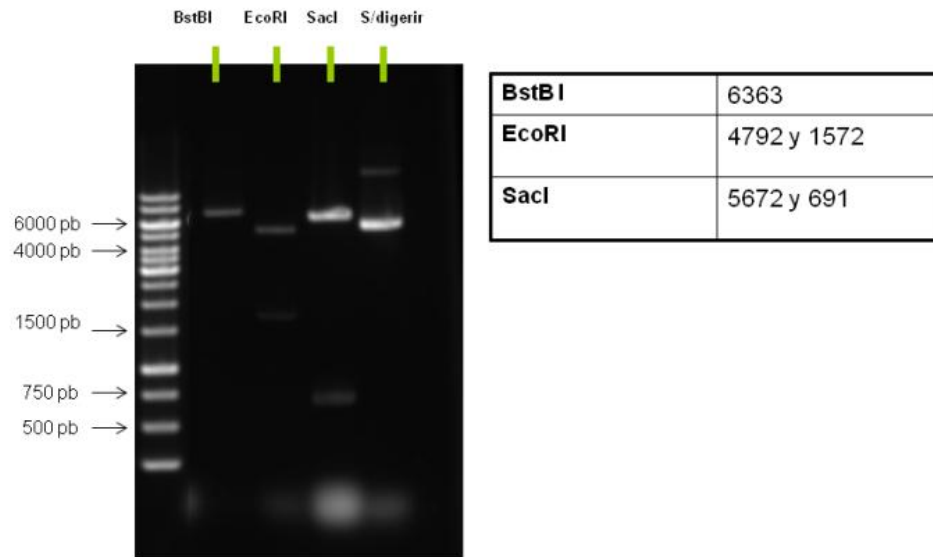


Figura 39: Identificación y confirmación del plásmido pVSVG, plásmido de envoltura. La estructura fue confirmada por análisis de restricción con *BstBI*, *EcoRI* y *SacI* mediante electroforesis en gel de agarosa.

*Identificación de pdelta 8,9 mediante enzimas de restricción*

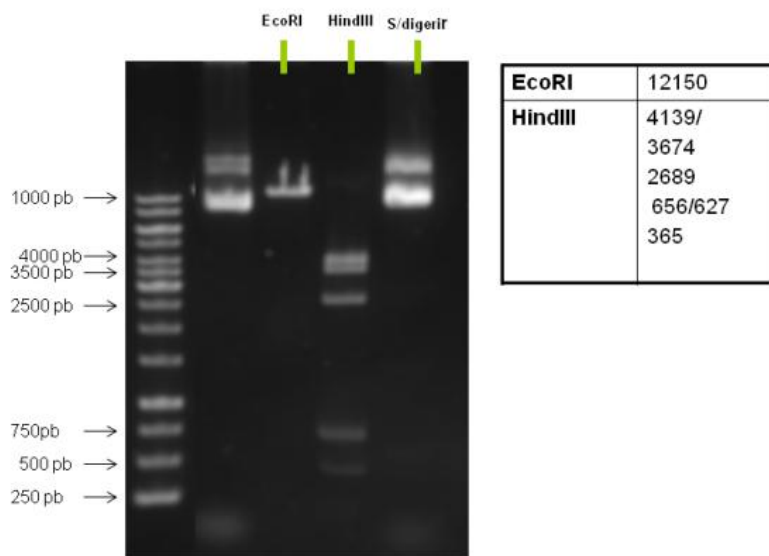


Figura 40: Identificación y confirmación del plásmido pdelta 8,9, plásmido de empaquetamiento. La estructura fue confirmada por análisis de restricción con *EcoRI* y *HindIII* mediante electroforesis en gel de agarosa.

Identificación de pexpress CAT mediante enzimas de restricción

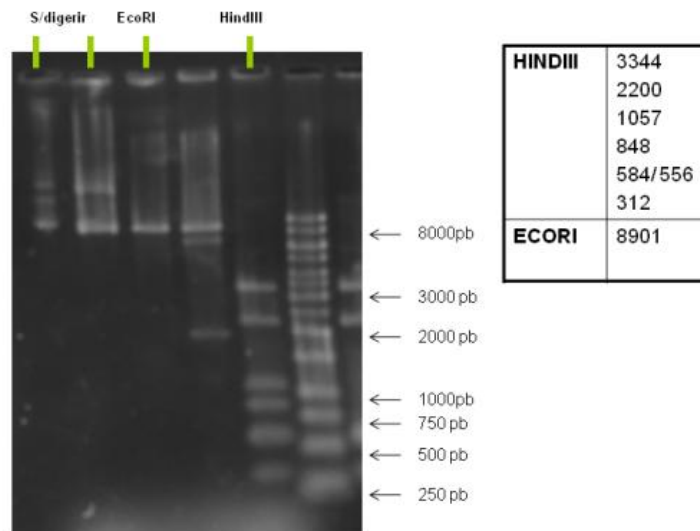


Figura 41: Identificación y confirmación del plásmido pexpress, plásmido control que codifica para la síntesis de CAT. La estructura fue confirmada por análisis de restricción con *EcoR* I y *Hind* III mediante electroforesis en gel de agarosa.

Identificación de pshRNA mediante enzimas de restricción

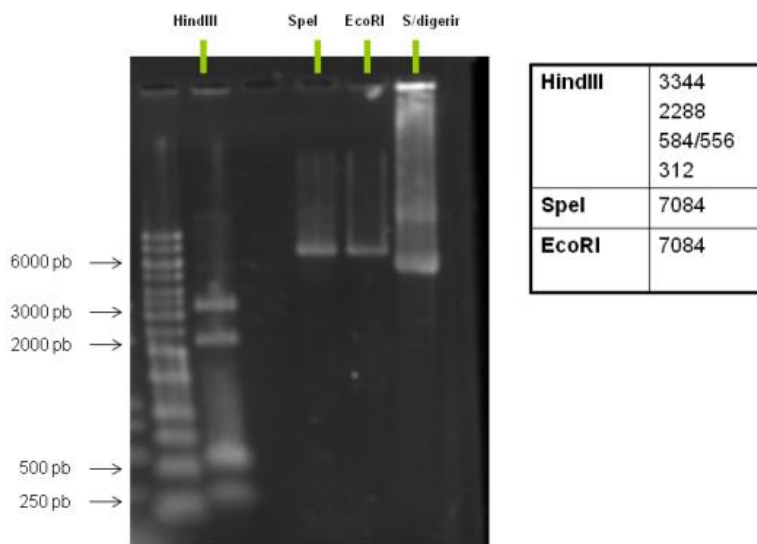
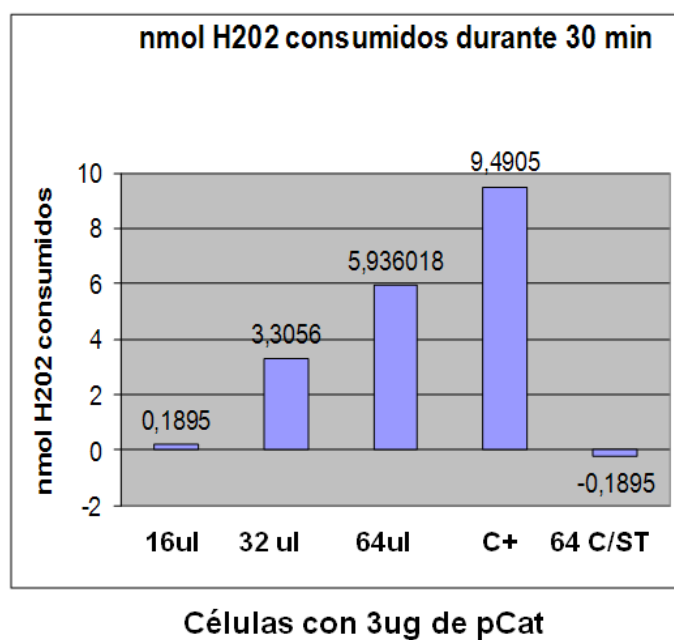


Figura 42: Identificación y confirmación del plásmido pshRNA, plásmido con el gen de interés shARN antiCAT. La estructura fue confirmada por análisis de restricción con *EcoR* I, *Hind* III y *Spe* I mediante electroforesis en gel de agarosa.

### Determinación de la actividad de CAT

Se determinó la actividad de CAT mediante la utilización de un kit comercial (*Biovision*). Como puede observarse en la figura 43 la actividad de la enzima se incrementó a medida que aumentó el volumen de células lisadas que fueron cultivadas con 3 ug de CAT de manera proporcional. Este resultado confirmó que las células HEK293T fueron transfectadas eficientemente con el plásmido pexpress, ya que esta línea celular no presenta basalmente actividad de CAT.

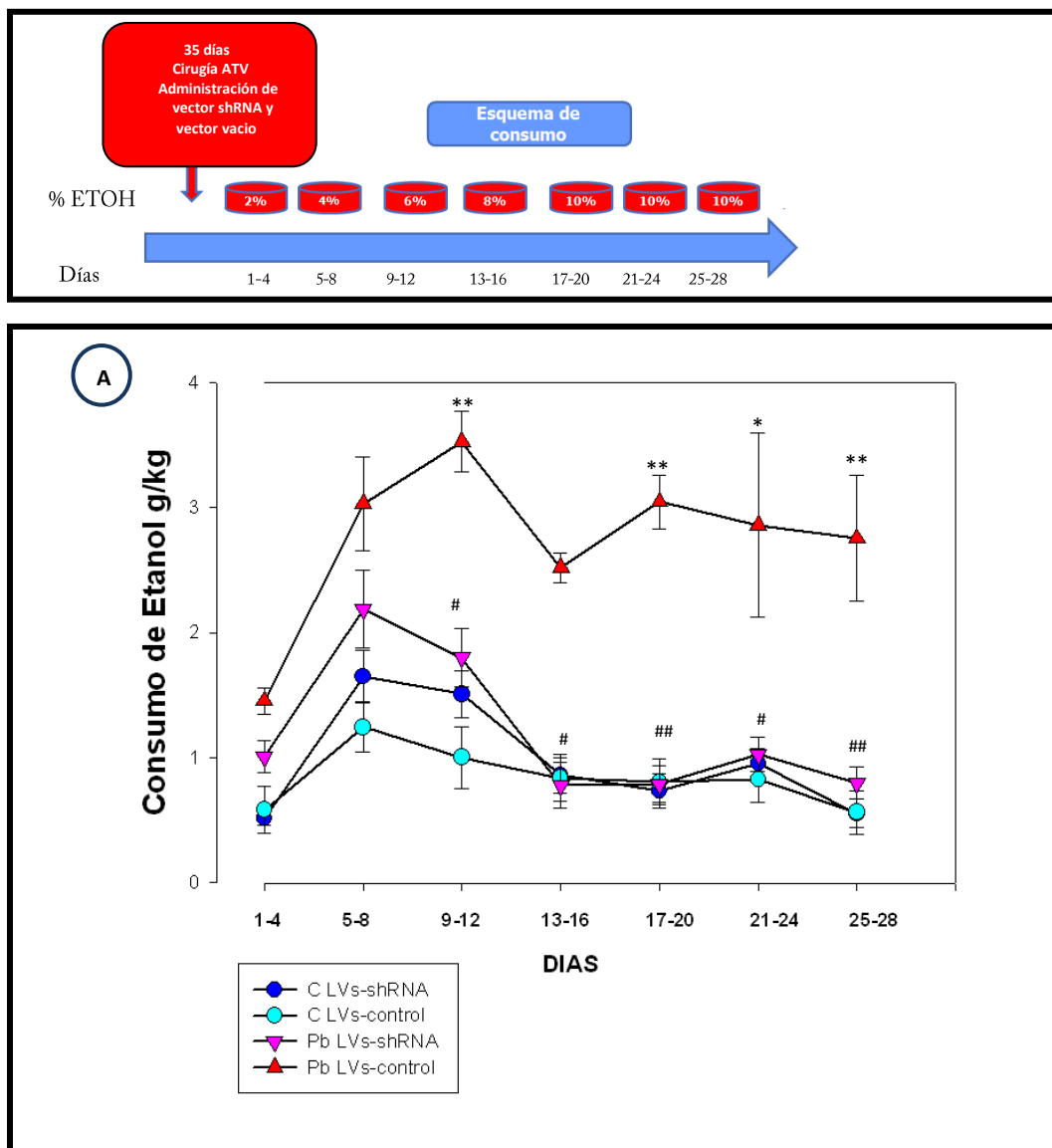


**Figura 43: Actividad de CAT.** En el gráfico se representa la actividad de la enzima expresada en nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumidos en función del volumen de células lisadas con 3 ug de CAT. C+ es el control positivo y 64C/ST el control negativo del volumen de 64 µl.

*Consumo voluntario de Etanol:**Administración del vector lentiviral previo a la fase de adquisición del consumo de ETOH:*

Los datos graficados en la figura 44A) corresponden al consumo voluntario de ETOH de animales C y perinatalmente expuestos a Pb durante los 28 días de duración del experimento. A los fines de facilitar su análisis y su observación siguiendo el análisis utilizado en los capítulos anteriores, se han compactado los días en los que la concentración de ETOH permaneció constante en bloques de 4 días (indicado por cilindros). Se ha representado nuevamente el consumo de ETOH expresado como g de ETOH consumido por Kg de peso corporal mientras que la figura 44B muestra la preferencia de ETOH sobre H<sub>2</sub>O, en ambos casos en función de los días agrupados por concentración de ETOH. Además, en la parte superior de ambos gráficos se encuentra esquematizado el protocolo experimental en el cual los animales como se explicó anteriormente fueron operados en DPN32, previo al inicio del esquema de consumo. De la observación de la figura 44 puede inferirse que a concentraciones de ETOH del 10% (día 21 del esquema), se evidencia un mayor consumo voluntario de ETOH, selectivamente en los animales expuestos a Pb que han sido infundidos con el vector vacío (panel izquierdo), manifestándose como una diferencia estadística con los grupos C que fueron infundidos con el vector control y con el vector shARN antiCAT y los animales expuestos a Pb infundidos con el vector shARN antiCAT. Estos últimos tres grupos, presentaron un bajo consumo durante todo el esquema, lo cual es de destacar puesto que en los animales expuestos a Pb la administración del lentivirus que codifica para suprimir la expresión de CAT, fue capaz de revertir el elevado consumo que se ha observado sostenidamente en estos animales. Por lo tanto, la administración del vector control y su falta de efecto en el grupo expuesto a Pb, evidencian que la infusión del virus por sí solo sin el gen que suprime la expresión de la enzima no deriva en ninguna consecuencia. Así, los datos obtenidos por la prueba de ANOVA para muestras repetidas indican un efecto significativo del factor tratamiento perinatal (C *vs* Pb):  $F(1,174)=96,42$ ;  $p<0,0001$ , de tratamiento (vector control *vs* vector shARN):  $F(1,174)=42,33$ ;  $p<0,0001$  así como para la interacción entre ambos  $F(1,174)=59,38$ ;  $p<0,0001$ , de la variable repetida (tiempo/concentración de ETOH):  $F(6,174)=15,14$ ;  $p<0,0001$ , y de la interacción entre grupo, tratamiento y la variable repetida:  $F(6,174)=2,84$ ;  $p<0,01$ .

De la misma manera, el pre-tratamiento con el vector lentiviral shARN fue capaz de disminuir la preferencia al ETOH diferencialmente en las ratas expuestas a Pb (figura 43B). El análisis estadístico reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,174)=77,98$ ;  $p<0,0001$ , tratamiento:  $F(1,174)=41,63$ ;  $p<0,0001$ , una interacción significativa entre grupo y tratamiento:  $F(1,174)=54,36$ ;  $p<0,0001$ , de la variable repetida  $F(6,174)=38,9$ ;  $p<0,0001$  así como en la interacción entre tratamiento y la variable repetida:  $F(6,174)=4,30$ ;  $p<0,05$  y una diferencia casi significativa de la interacción entre tiempo x grupo x tratamiento  $F(6,174)=2,08$ ;  $p=0,057$ , lo cual fue estadísticamente significativo en las concentraciones del 6% y del 8% de ETOH, tal como lo reveló la prueba de Tuckey.



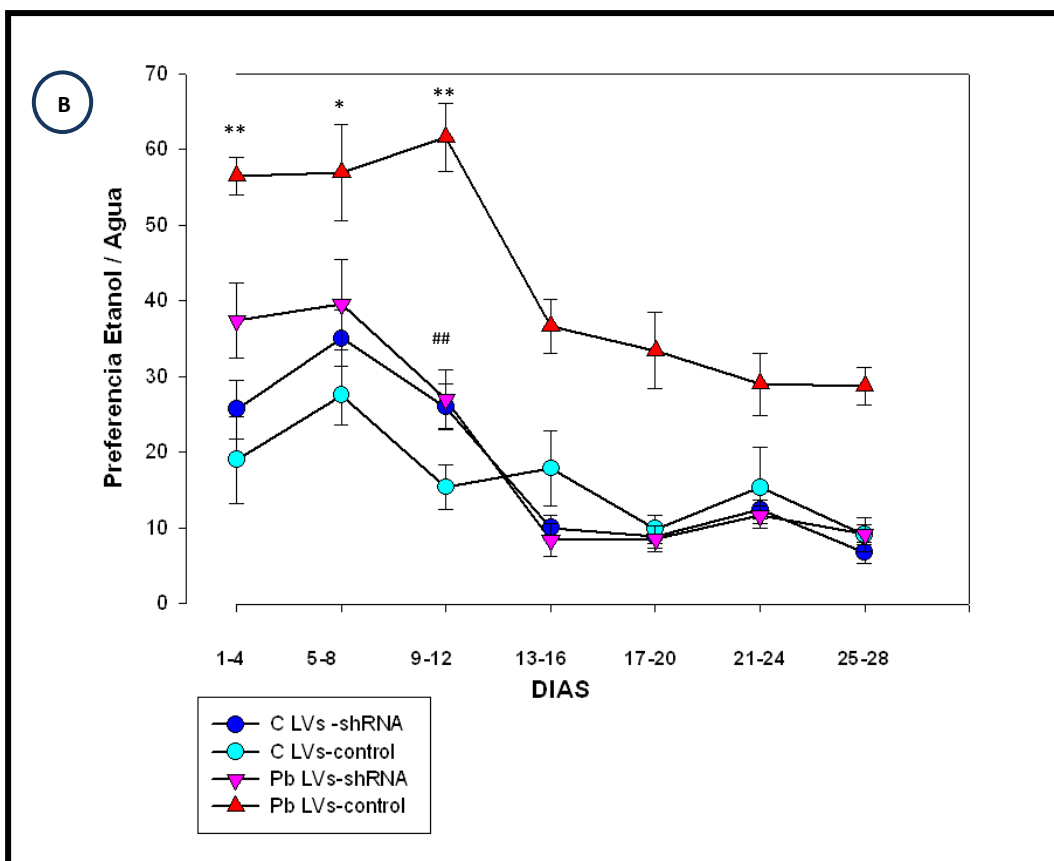


Figura 44: Esquema de consumo voluntario de ETOH en respuesta a la administración del vector lentiviral previo a la fase de adquisición del consumo de ETOH. En la parte superior se representa el protocolo esquema experimental usado. A) Consumo de ETOH expresado como g de ETOH/kg de peso corporal. B) Relación de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media  $\pm$  ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal y corresponden al aumento de las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; 9-12 días: 6%; 13-16 días: 8%, y días 17-28: 10%). \* indica  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,01$  en comparación con los C (C C-lenticontrol vs Pb-lenticontrol) #denota diferencias entre los Pb-lentishRNA y Pb-lenticontrol con #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,01$ . C-lentishRNA=10; C-lenticontrol=5; Pb- lentishRNA=10; Pb-lenticontrol=6 animales por grupo.

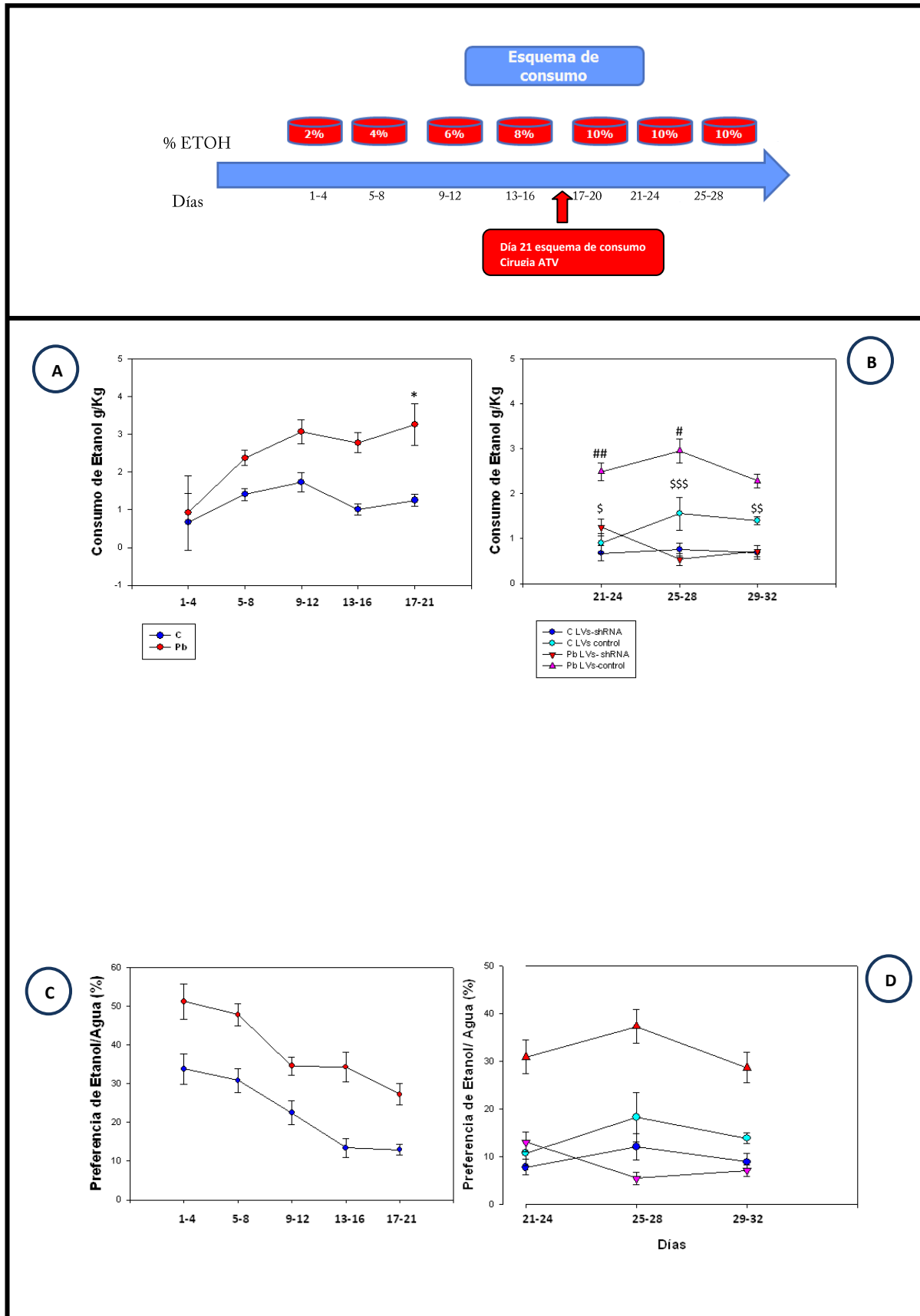
Administración del vector lentiviral en el día 21 del esquema de consumo voluntario.

Consumo basal: la figura 45 (izquierda) representa el consumo voluntario de ETOH (días 1-20). Tal como se demostró previamente se evidencia una elevada ingesta de ETOH en los animales expuestos perinatalmente a bajas dosis de Pb. Esta diferencia fue significativa a partir de la concentración del 10% si bien previamente se observa una marcada tendencia ascendente en los animales expuestos al Pb, mientras que en los animales C muestran desde el inicio un consumo relativamente bajo y estable. El análisis

estadístico reveló un efecto significativo de grupo:  $F(1,124)=25,75$ ;  $p<0,0001$ , de la variable repetida:  $F(4,124)=16,11$ ;  $p<0,0001$ , y su interacción:  $F(4,124)=4,96$ ;  $p<0,001$ . En el caso de los datos de preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, el ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló un efecto significativo del grupo:  $F(1,124)=87,61$ ;  $p<0,0001$  y la variable repetida:  $F(4,124)=19,635$ ;  $p<0,0001$ , mientras que la interacción entre ambos no fue significativa.

Consumo en respuesta a la administración del vector lentiviral: en la figura 45 (derecha), puede observarse el efecto de la administración durante 12 días del vector lentiviral en el consumo voluntario de 10% ETOH. Los datos analizados, demuestran que la administración del vector lentiviral shARN fue capaz de revertir el elevado consumo de ETOH en los animales que estuvieron expuestos al Pb de manera similar a lo observado con la administración del vector shARN previo al inicio del esquema de consumo, mientras que en este grupo la administración del vector control no tuvo ningún efecto sobre la ingesta. En tanto que en los animales C, en concordancia con los datos obtenidos previamente no se observó ningún efecto en el consumo bajo que estos mantenían. El análisis estadístico del ANOVA reflejó un efecto significativo de grupo:  $F(1,58)=36,84$ ;  $p<0,0001$ , tratamiento:  $F(1,58)=97,95$ ;  $p<0,0001$ , de la intersección entre ambos grupo x tratamiento:  $F(1,58)=24,82$ ;  $p<0,0001$  y de la intersección de tiempo x grupo:  $F(2,58)=3,33$ ;  $p<0,05$  y tiempo x tratamiento:  $F(2,58)=5,74$ ;  $p<0,05$ , mientras que la intersección de tiempo x grupo x tratamiento no fue significativa. En cuanto al análisis de la preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, se observó nuevamente una mayor preferencia de ETOH en el grupo expuesto al Pb que fue administrado con el vector control, en tanto que esta preferencia disminuyó notablemente en este grupo cuando se les administró el vector shRNA con una diferencia significativa en el grupo:  $F(1,58)=32,11$ ;  $p<0,0001$ , tratamiento:  $F(1,58)=90,96$ ;  $p<0,0001$ , la intersección grupo x tratamiento:  $F(1,58)=40,49$ ;  $p<0,0001$  y tiempo x tratamiento:  $F(2,58)=3,25$ ;  $p<0,05$ .





**Figura 45: Esquema de consumo voluntario de ETOH en respuesta a la administración en el día 21 del vector lentiviral.** En la parte superior se representa el esquema experimental usado. A-C) Consumo de ETOH expresado como g de ETOH/kg de peso corporal. B-D) Relación de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media  $\pm$  ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal y corresponden al aumento de las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días 13-16: 8%, y días 17-28: 10%). \* indica  $p < 0,05$  en comparación con los C. Administración del vector lentiviral: #denota diferencias entre C-lenticontrol y Pb-lenticontrol # $p < 0,01$  y ## y \$ indica diferencia entre Pb-lentishRNA y Pb-lenticontrol con \$  $p < 0,01$ , \$\$  $p < 0,001$  y \$\$\$  $p < 0,0001$ . C-lentishRNA=10; C-lenticontrol=6; Pb-lentishRNA=11; Pb-lenticontrol=6 animales por grupo.

### **Discusión:**

Los resultados obtenidos proporcionan nuevas y más robustas evidencias de la participación de CAT cerebral en el aumento del consumo voluntario de ETOH en ratas expuestas perinatalmente a Pb. Podemos observar como la microinfusión del vector lentiviral shARN antiCAT en ATV, fue capaz de producir una disminución significativa del mayor consumo observado diferencialmente en los animales expuestos a Pb en comparación con los C. Tanto la administración del vector lentiviral previa a la fase de adquisición del consumo voluntario (DPN32) así como durante el esquema de consumo voluntario cuando se alcanzó una concentración del 10% de ETOH (DPN56) produjo en ambos casos una disminución significativa del consumo de ETOH en el grupo expuesto a Pb. No se observó ningún efecto en la ingesta de ETOH en los animales expuestos a Pb cuando éstos fueron microinfundidos con el vector vacío, evidenciando estos animales tal como se demostró anteriormente un elevado consumo en comparación con los respectivos C infundidos con el vector vacío. Por lo tanto, la disminución en el consumo de ETOH en los animales expuestos a Pb se produjo como consecuencia de la administración del vector lentiviral que suprime la expresión de CAT. Estos resultados destacan nuevamente el rol crítico de la enzima CAT en la contribución del metabolismo central del ETOH. Esta afirmación se encuentra sustentada asimismo por numerosos estudios en los que los niveles de CAT son manipulados ya sea farmacológicamente o mediante la terapia génica tal como lo demuestran recientes trabajos publicados (Karahanian y cols, 2011).

La utilización de este tipo de estrategia, en donde se emplean vectores lentivirales o adenovirus como vehículos para transportar e incorporar determinados genes específicos al interior de las células, con la posibilidad de circunscribir el área

específica en donde serán expresados, ha comenzado a ser muy utilizada para dilucidar determinados mecanismos farmacológicos y fisiológicos (Feigen y cols, 2007). La ventaja que conlleva la utilización de vectores lentivirales, reside en el hecho que pueden ser incorporados al genoma de las células que infectan de manera permanente (Hu y Pathak, 2000), poseen una alta eficiencia y especificidad, y son considerados seguros para transportar genes al interior de neuronas (Kitagawa y cols, 2007). Además la utilización de estrategias genéticas experimentales, en el caso del ETOH teniendo en cuenta la importancia del metabolismo central en los efectos reforzantes del mismo permite obtener conclusiones más certeras con respecto al posible rol de CAT (y del ACD formado localmente a nivel cerebral) sobre los efectos motivacionales del ETOH.

Estos resultados se encuentran en concordancia con los presentados por Karahanian y cols (2011), en los que se demuestra que la administración intraATV de un vector lentiviral shARN antiCAT es capaz de disminuir en aproximadamente un 94% el consumo de ETOH en cepas de ratas que prefieren autoadministrarse ETOH (UChB). Esta disminución del consumo además se encuentra acompañada con una disminución de la liberación de dopamina en Nac. Esto resulta de particular importancia, ya que se ha demostrado que la administración de ACD intraATV, produce la liberación de dopamina en Nac (Diana y cols, 2008). Por estas razones estos autores han postulado que los animales tratados con el vector lentiviral vacío responden al ETOH produciendo la liberación de dopamina en Nac, mientras que esta respuesta se encuentra reducida en los animales tratados con el lentivirus shRNA antiCAT. Estas evidencias proporcionan una evidencia adicional del papel fundamental que desempeña la CAT en el metabolismo central en la producción de ACD y como éste influencia conductas asociadas al ETOH.

Con respecto a aspectos anatómicos es importante destacar, que existen ciertas aéreas cerebrales que presentan una mayor proporción de actividad de CAT, la cual se ha demostrado que se localiza principalmente a nivel de las neuronas aminérgicas (Zimatkin y cols, 1995). El ATV es una zona primordial dentro del sistema de recompensa en el área mesocorticolímbica y que además presenta una rica expresión de CAT (Correa y cols, 2012), con una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas en donde el 60% de la población de estas neuronas se ubica a nivel de dos núcleos principales entre ellos el PBP (Sanchez-Catalán, 2014). Las neuronas dopaminérgicas ubicadas en ATV proyectan a diferentes zonas del cerebro, especialmente al Nac las cuales se activan tras la administración de drogas de abuso produciendo una mayor

liberación de dopamina en los lugares de proyección. La activación de las neuronas dopaminérgicas de ATV es un fenómeno clave para lograr la activación del sistema de recompensas (Pankseep y cols, 1998; Ikemoto y cols, 2007). Esta área por lo tanto fue seleccionada para inyectar los vectores lentivirales, debido al papel fundamental que desempeña en la adicción a drogas. Numerosas evidencias señalan que, manipulaciones del ATV pueden modificar los patrones de ingesta de ETOH en ratas (Hodge y cols, 1993; Katner y cols, 1997) y resulta interesante destacar que existe una selectividad neuroanatómica que se encuentra relacionada a los efectos conductuales asociados a ETOH en el ATV. Al respecto, se ha demostrado que los animales prefieren auto administrarse ETOH en ATV posterior y no en el anterior (Rodd-Henricks y cols, 2000; 2003; Rodd y cols, 2004b; Ding y cols, 2014), lo mismo se ha reportado en relación a la actividad locomotora en donde la infusión de ETOH en ATV posterior produce un incremento de la misma (Sanchez-Catalán y cols, 2009). Además, en cepas de ratas que prefieren ETOH, dosis bajas del mismo en ATV posterior son capaces de provocar su autoadministración (Rodd y cols, 2005b, c). Por otra parte, se ha visto que estas mismas cepas prefieren autoadministrarse ACD en ATV posterior que en anterior y que la coadministración de un agonista de receptores dopaminérgicos como el quinpirol es capaz de bloquear esta autoadministración (Rodd-Henricks y cols, 2002; Rodd y cols, 2005d). Microinyecciones de ACD en ATV posterior, también fueron capaces de incrementar la actividad locomotora en ratas (Sánchez-Catalán y cols, 2009). Además la utilización de D- penicilamina en ATV posterior (agente secuestrante del ACD) también produjo una reducción de la actividad locomotora inducida por ETOH (Martí-Prats y cols, 2010). Por el contrario, el pretratamiento con CIAN inhibidor de la ALDH intra ATV posterior, lo cual reduce la degradación de ACD estimula la actividad locomotora con dosis de ETOH que no son muy altas ((Martí-Prats y cols, 2013). Más aún, la reciente demostración de que, la administración intraATV posterior de D-penicilamina puede bloquear la recaída en un modelo preclínico de privación de ETOH, sugiere además un potencial uso terapéutico de estos compuestos (Orrico y cols, 2013). Por último, se ha demostrado que el ACD es capaz de incrementar el disparo de neuronas dopaminérgicas en ATV de similar manera al ETOH (Quertemont y cols, 2005). Se ha propuesto entonces que, tanto el ETOH como el ACD son responsables de la activación por lo tanto, de las células dopaminérgicas en ATV posterior con el consecuente incremento de la liberación de dopamina en Nac (Melis y cols, 2007, 2013; Xie y cols, 2012; Ye y cols, 2012), lo cual sugiere que tanto el ETOH

como ACD se encuentran implicados a nivel de ATV posterior en la activación de efectos conductuales relacionados con el ETOH (Martí-Prats y cols, 2013).

En resumen, estos resultados en concordancia con los obtenidos por Karahanian y cols (2011) sugieren que los efectos de recompensa y reforzamiento relacionados al ETOH estarían relacionados con la generación de ACD a nivel cerebral, en donde quizás el ATV representaría un área fundamental. Esto permite la posibilidad de abordar nuevas vías terapéuticas para reducir el consumo crónico de ETOH al prevenir específicamente el metabolismo central de ETOH intraATV sin afectar otras propiedades reforzantes ni sistemas enzimáticos a través de la inhibición de la generación de ACD a nivel central.

*Como conclusión parcial: La microinfusión del vector lentiviral shARN antiCAT en ATV, fue capaz de producir una disminución significativa del mayor consumo observado diferencialmente en los animales expuestos a Pb en comparación con los C. Estos resultados destacan nuevamente el rol crítico de la enzima CAT en la contribución del metabolismo central del ETOH.*

Capítulo IV: “*Evaluación de las propiedades motivacionales de ETOH en un paradigma de autoadministración oral en cajas de Skinner*”.

## Capítulo IV: “Evaluación de las propiedades motivacionales de ETOH en un paradigma de autoadministración oral en cajas de Skinner”.

### Marco teórico:

#### *Reforzamiento positivo*

El reforzamiento positivo se define como el proceso por el cual una respuesta o conducta será fortalecida sobre las bases de experiencias previas. La definición de un reforzador se basa en el aumento de una conducta, es decir de una asociación aprendida. El reforzamiento positivo, se define como el proceso en el cual la presentación de un estímulo va a tender a incrementar la posibilidad de que se produzca una respuesta. La importancia del reforzamiento positivo radica en que se encuentra implicada en las primeras fases de la adicción, en donde entran en juego los efectos euforizantes y estimulantes que produce la droga, manifestándose como un deseo compulsivo por la misma o “*craving*” (Gilpin y Koob, 2008; Heiling y Koob, 2007). Las drogas son identificadas como reforzadores, si la probabilidad de una respuesta de búsqueda se incrementa cuando es asociada con la exposición de la droga (Self y Nestler, 1995). En la teoría del aprendizaje operante, si los efectos de beber ETOH aumentan la probabilidad que esa conducta se repita en el futuro, entonces estos efectos son reforzadores.

Los estudios en animales adultos han sugerido que el ETOH es un reforzador más bien débil (Samson y cols, 2000). Sin embargo, cuando se comparó el ETOH con otras drogas, se demostró que en determinadas circunstancias (predominantemente cuando la administración es intravenosa y con un programa de reforzamiento continuo de 3 sesiones diarias), el ETOH puede ser un reforzador tan potente como otras drogas sedativas y mostrar un patrón similar de administración (Arnold y cols, 1997). No obstante, cuando el requerimiento de respuesta aumento de 1 a 30, la tasa de respuesta disminuyó notablemente en comparación con otras drogas. Lo mismo se observó cuando se presentaron pequeñas cantidades de ETOH luego de un número modesto de radio fijo de palanqueos (por ejemplo 16-32), los animales no fueron capaces de mantener las tasas de respuesta en comparación con otras drogas administradas oralmente y con

comida (Meisch y Thompson, 1973). Estos datos por lo tanto han llevado a suponer y sugerir que en realidad el ETOH se comportaría como un reforzador débil.

Sin embargo, se ha observado que el efecto reforzante de ETOH es dependiente de la ontogenia del animal (Molina y cols, 2005; March y cols, 2013). En relación a esto, ratas lactantes son capaces de ingerir altas concentraciones de ETOH (hasta del 30%) sin necesidad de entrenamiento previo (Truxell y Lanza, 2004; Sanders y Lanza, 2007, Truxell y cols, 2007). Además, se ha reportado que animales recién nacidos son capaces de adquirir rápidamente una respuesta condicionada a muy bajas dosis de ETOH utilizando un pezón artificial (Petrov y cols, 2003). Se ha relacionado al metabolismo central como uno de los factores responsables, ya que el mismo al igual que el reforzamiento también difiere a través de la ontogenia (Del Madero y cols, 1987). Al respecto, la CAT enzima encargada de oxidar el EtoH en cerebro presenta una mayor actividad en animales lactantes e infantes en comparación con los adultos (Gill y cols, 1992; Hamby-Mason y cols, 1997). Como consecuencia de esto, durante la edad temprana se encontrarían altos niveles de ACD a nivel central mientras que a nivel periférico se produciría una lenta formación de ACD como resultado de una menor actividad de ADH en hígado. Por lo que, la CAT sería la enzima principal encargada de oxidar ETOH durante las etapas tempranas de vida, principalmente a nivel cerebral (Del Madero y cols, 1987; March y cols, 2013). Teniendo en cuenta estas consideraciones, es posible especular que el mayor efecto reforzante encontrado en los animales infantes sería resultado de su alta generación a nivel cerebral de ACD. Casualmente, recientemente se ha encontrado que el ACD tendría un papel crucial en el reforzamiento de ETOH en animales recién nacidos.

#### *Modelos de autoadministración de ETOH en animales*

Muchos son los factores tanto neurológicos como ambientales que influyen la motivación para ingerir ETOH (Grant y cols, 1995; Sansón y Hodge, 1996; Vengeliene y cols, 2008; y cols, 2009). La propensión a beber se trataría de un reflejo del equilibrio entre los efectos positivos de refuerzo (recompensa) del ETOH (euforia, ansiólisis) y los efectos aversivos asociados a las consecuencias negativas de su consumo (resaca, abstinencia). Además, los recuerdos asociados con las cualidades tanto gratificantes como aversivas del ETOH, así como también las asociaciones aprendidas entre estos estados internos y los estímulos/contexto ambiental, juegan un papel crítico no solo en la iniciación sino también en la regulación de la ingesta. Los niveles de ingesta de ETOH



y la vulnerabilidad a la recaída son rasgos distintivos que caracterizan a la dependencia por ETOH y el alcoholismo. Como consecuencia de esto, el desarrollo de modelos animales que sean capaces de incorporar estas características claves de comportamiento es un rasgo fundamental para el estudio de las bases biológicas y ambientales del alcoholismo. Además estos modelos son cruciales para identificar nuevas dianas terapéuticas potenciales y para evaluar las diversas estrategias de tratamiento ya disponibles (Becker y cols, 2012).

Los métodos basados en la autoadministración son ampliamente utilizados en el ámbito de la investigación básica/preclínica del abuso de drogas, reflejan de manera adecuada el consumo de drogas en los seres humanos. Estos procedimientos parecen ser modelos adecuados para dilucidar mecanismos neuronales comunes y por lo tanto ayudan a identificar estrategias útiles de intervención farmacológica en relación al consumo de drogas en humanos (Sanchis-Segura y Spanagel, 2006).

Existen numerosos modelos que se pueden utilizar para evaluar el consumo de ETOH en condiciones de acceso limitado o continuo, por ejemplo en la propia caja en la que se aloja el animal o "*homecage*" o en paradigmas de autoadministración operante o instrumental (Samson y cols, 1998). En ambos casos, el animal es capaz de controlar la ingesta de ETOH, la dosis y los patrones temporales de ingesta, pero ambas pruebas se diferencian principalmente en el tipo de comportamiento requerido para obtener el ETOH (Spanagel y cols, 2003; Cunningham y cols, 1993). Gracias a la utilización de estos modelos se ha podido comprobar dos importantes hipótesis, en primer lugar la capacidad del ETOH de ser autoadministrado, independientemente de la restricción calórica y de fluido y por otro la demostración que la administración del ETOH por vía oral es capaz de funcionar como reforzador y mantener comportamientos relacionados con la presentación del mismo (Samson y cols, 1998). Por lo tanto, estos modelos resultarían útiles para analizar el comportamiento humano ya que los bebedores habitualmente consumen ETOH en circunstancias en las cuales pueden controlar la cantidad, así como los patrones de consumo. Por consiguiente, estos modelos ofrecen la posibilidad de comprender la naturaleza de los efectos motivacionales que influyen en la autoadministración de ETOH, así como de sus efectos farmacológicos, tales como el incremento del placer y la disminución del estrés y la ansiedad (Cunningham y cols, 2000).

En los modelos de "*homecage*", como se explicó con anterioridad se le ofrece al animal la opción de consumir agua o ETOH, ya sea durante 24 hs o bien por períodos

delimitados de tiempo. Mientras que en los modelos de conducta instrumental se basan en el aprendizaje condicionado, involucrando modificaciones tanto en el comportamiento como en respuestas a cambios en el ambiente que los rodea. Pueden clasificarse en dos tipos principales: condicionamiento clásico o Pavloviano y condicionamiento operante o instrumental. En el condicionamiento clásico el propio estímulo es capaz de producir una respuesta, en este sentido los estímulos biológicamente relevantes como el alimento y el sexo actúan como estímulos incondicionados y las mismas drogas de abuso, también pueden actuar como estímulo incondicionado (Kryukov y cols, 2012). El condicionamiento operante, tiene su origen en la teoría psicológica desarrollada por Skinner basado en el condicionamiento instrumental (Skinner, 1938). En este sentido, el animal debe aprender a realizar una tarea, ya sea accionar una palanca o introducir el hocico en un hoyo para obtener una recompensa, que en este caso sería la droga de abuso (Spanagel y cols, 2000, 2003; Cunningham y cols, 2000); La base fundamental de este tipo de paradigma es la contingencia entre la respuesta requerida al animal y el refuerzo que recibe como consecuencia de la misma. Así, cuando una situación es reforzante (una droga de abuso por ej) es contingente con una respuesta (presionar una palanca o introducir el hocico en un hoyo) la probabilidad de que aparezca dicha conducta aumenta (Skinner, 1938). Se trata de un modelo ampliamente utilizado y quizás sea el de mayor capacidad predictiva para el estudio de los procesos neurobiológicos que subyacen en la adicción. Este modelo nos permite evaluar de forma directa la eficacia y poder reforzante de una droga, así como también diferentes procesos implicados en la conducta adictiva tales como adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. De hecho, la frecuencia de la respuesta de los animales se correlaciona directamente con las propiedades gratificantes y adictivas de la droga (Higgins y cols, 1994). La autoadministración se ha utilizado ampliamente para evaluar las propiedades de refuerzo y adicción en la mayoría de las drogas de abuso, tales como cocaína (Koob y cols, 2004), morfina, heroína (Cooper y cols, 2010), ketamina (De Luca y Badiani, 2011), nicotina y ETOH (Burattini y cols, 2006; Manzardo y cols, 2002), lo cual ha proporcionado información esencial del cerebro y de los circuitos cerebrales implicados en el abuso de drogas. Ciertamente se ha demostrado con la utilización de modelos de autoadministración que drogas que son adictivas a nivel humano también lo son a nivel de animales de laboratorio (Gardner y cols, 2002).

El procedimiento se efectúa en cajas operantes que se encuentran equipadas con palancas u hoyos (como puede observarse en la figura 46). Durante la prueba uno de los

dispositivos permanecerá activo, lo cual permitirá que cuando el animal lo accione se produzca la entrega de la droga de acuerdo a la ruta seleccionada. El otro dispositivo permanecerá inactivo, de tal manera que su accionamiento no conducirá a ninguna acción. Para que el animal sea capaz de aprender la conducta operante de autoadministración debe ser sometido a una fase de entrenamiento en la que se establecen ciertos criterios: 1) el animal tiene que aprender a discriminar entre la palanca activa y la inactiva 2) se requiere un mínimo de refuerzos por sesiones (Soria y cols, 2005). Los animales van a ser entrenados con un reforzador natural para descartar posibles deficiencias en el aprendizaje de la conducta operante. Se utilizan en la mayoría de los casos, protocolos de tipo “razón fija”, sesiones en donde el número de respuestas requeridas para obtener el esfuerzo es fijo en cada sesión. Así la razón fija 1 (FR1), el animal debe por ejemplo presionar una vez la palanca para obtener una infusión de la droga estudiada. Existen otros protocolos más complejos como razón variable, intervalo fijo, intervalo variable, patrones de segundo orden, etc.

La ruta de autoadministración depende la droga que se utilice y al objetivo que se pretenda dilucidar. La autoadministración oral en general se utiliza como alternativa para las soluciones con ETOH. El accionar de una palanca o el hoyo activo permite que el animal tenga acceso a un receptáculo situado entre ambas palancas o agujeros en el que se encuentra la solución y permite conocer la cantidad consumida por el animal.

Como consecuencia de que la solución de ETOH, va a ser autoadministrada al principio puede resultar aversiva, se realiza una fase de entrenamiento a un FR1 (un esfuerzo una respuesta) con una solución palatable (ej. sucrosa). Se comienza con un porcentaje elevado de esta última y reducido de ETOH; a medida que transcurren las sesiones se va disminuyendo de manera progresiva la concentración de sucrosa, mientras que se va aumentando la de ETOH, hasta llegar a una solución del 10% de ETOH y libre de sucrosa (Samson y cols, 1986; Roberts y cols, 1998; Roberts y cols, 2001; ). La adición de sucrosa a las soluciones de ETOH da como resultado un incremento de la autoadministración de ETOH (Samson y cols, 1986), lo cual se ha comprobado no altera la absorción o metabolismo de la droga resultando en concentraciones de ETOH en sangre similares a aquellas en las cuales no se utiliza la solución (Czachowski y cols, 1999a). Al respecto se ha demostrado que en ciertos individuos la solución de sucrosa/ETOH es más preferida que una de sucrosa sola (Heyman y cols, 1993; Archivos y cols, 1995; Slawewski y cols, 1997).

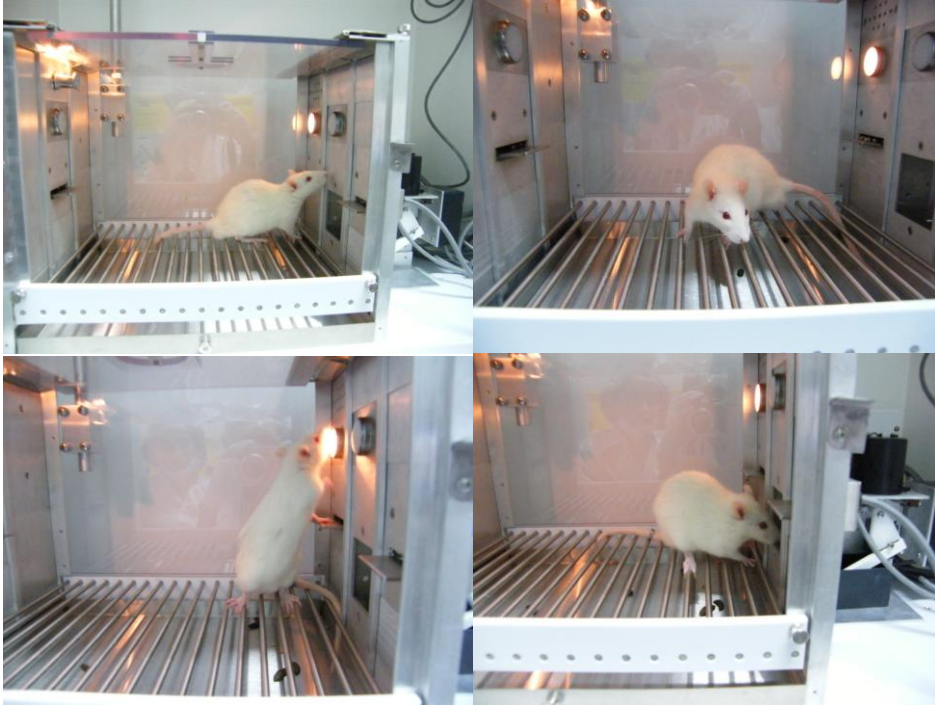


Figura 46: Modelo de caja de conducta operante de Skinner. En la figura se observa piso con rejas, palanca activas del lado derecho e inactiva del lado izquierdo, iluminación de la caja y receptáculo de ETOH (derecha).

### *Conducta apetitiva y consumatoria*

Los etólogos y neurobiólogos han diferenciado conductas en las que se encuentran involucradas la obtención de un reforzamiento (comportamiento apetitivo) y las relacionadas con el consumo de la sustancia obtenida (comportamiento consumatorio). Se ha propuesto que cada una de ellas incluso estaría regulada por procesos neurofarmacológicos separados (Samson y cols, 2000) (figura 47).

El comportamiento apetitivo implica todas aquellas conductas relacionadas con la búsqueda y se encuentra bajo control de procesos motivacionales y de aprendizaje complejo. Tiene lugar al principio de una secuencia natural de conducta y sirve al organismo en el primer contacto con un estímulo desencadenante. Es variable, susceptible de modificaciones, lo guían estímulos distales. En tanto, el comportamiento consumatorio abarca conductas prefijadas, reflejas y no modificables, dependen de estructuras en el SNC que están determinadas genéticamente, además es producida por estímulos proximales. Se trata del comportamiento que tiende a consumir o completar una secuencia natural de conducta y relacionadas con el consumo, básicamente como el acto de colocar la sustancia en la boca y tragar (Cazchowki y cols, 1999).

En el caso de los modelos de consumo voluntario de ETOH “*homecage*” si bien ambos procesos participan, estos se centran más en los procesos consumatorios, identificados como el volumen total de ETOH consumido (Cunningham y cols, 2000). De hecho, una de las limitantes inherentes que presentan este tipo de modelos es que se centran en los procesos consumatorios lo que conlleva la dificultad de demostrar la motivación del animal por obtener ETOH. Esta motivación puede ser demostrada utilizando modelos de conducta operante, en donde el animal debe efectuar una tarea para recibir u obtener una determinada cantidad de ETOH (Tabakoff y cols, 2000). Estos modelos por lo tanto, permiten poner mayor énfasis en los procesos apetitivos. El comportamiento apetitivo puede evaluarse en este tipo de modelos, en los cuales el acceso a ETOH es contingente al comportamiento del animal bajo el requerimiento de una respuesta. Por ejemplo, el experimentador puede variar la complejidad de la respuesta que debe realizar el animal para obtener ETOH mediante un trabajo de presión de palanca o aumentando progresivamente el requerimiento de palanqueo (Samsons y cols, 1985). De esta forma se puede evaluar el grado de motivación que experimenta el animal para buscar el ETOH (Samson y Doyle, 1985). En resumen, en un modelo de conducta operante la conducta apetitiva está relacionada con el número de palanqueos que efectúa el animal, mientras que la conducta consumatoria con el número de lamidas y el volumen de ingesta de la solución de ETOH (Samson y cols, 1998). Por lo tanto, en un modelo de conducta operante se puede medir tanto la búsqueda de ETOH (a través del número de palanqueos) como así también el volumen de ETOH ingerido (Cunningham y cols, 2000). Por ejemplo, en el caso de un episodio de borrachera, las conductas apetitivas y consumatorias se repiten una y otra vez, permitiendo que el individuo tenga acceso a pequeñas cantidades de ETOH durante cada secuencia; lo cual posiciona al modelo de conducta operante como uno de los que mejor refleja las conductas asociadas al ETOH.

### Control regulador de la ingesta de Etoh



Figura 47: diferencias entre la conducta apetitiva y consumatoria.

*Evidencias del estudio del metabolismo de ETOH por conducta operante*

Como se ha expresado anteriormente, numerosos trabajos han demostrado que la oxidación cerebral del ETOH posee importantes implicaciones biológicas y conductuales asociadas al uso y abuso de la droga. El alcoholismo se caracteriza por una compulsión de búsqueda y consumo de ETOH y por la pérdida de control que se tiene sobre este consumo.

Se ha demostrado que, el ETOH es una droga con efectos reforzantes capaz de inducir su autoadministración en paradigmas de conducta operante no solo a nivel oral (Amit y cols, 1977; Numan y cols, 1981; Pfeiffer y cols, 1985; Grant y cols, 1985, 1986; Tolliver y cols, 1991), intragástrico (Davis y cols, 1976, 1979), intravenoso (Smith y cols, 1974, 1982) intracraneal (Crow y cols, 1970; Vrtunski y cols, 1973) sino también en áreas cerebrales específicas como ATV posterior (Rodd-Henricks y cols, 2000, 2002, 2005) y no solo en cepas de ratas que prefieren consumir ETOH como cepas de ratas P (Cannon y cols, 1987, 1988; Samson y cols, 1989; Gatto y cols, 1994; Roberts y cols, 1996), cepas de ratas ANA (Samson y cols, 1989), ALKO (Ritz y cols, 1989) sino también en ratas Wistar (Rodd-Henricks y cols, 2000) y cepas de ratones (Keller y cols, 1996; Grahame y cols, 1997; Rissinger y cols, 1998).

Al respecto y asociado al proceso metabólico del ETOH, se ha demostrado que la administración de alfa-lipoico (ALA, ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico) fue capaz de reducir la autoadministración oral de ETOH en ratas (Peana y cols, 2013). Este compuesto es un cofactor esencial de enzimas mitocondriales y también se ha descrito como un potente antioxidante biológico y secuestrador de radicales libres (Somani y cols, 2000), además se ha demostrado que disminuye la concentración de EROS y principalmente de  $H_2O_2$  (Bilskiet y cols, 2007). Los resultados de este estudio apoyan la idea de que una disminución de la producción de  $H_2O_2$  cerebral mediante la administración de ALA inhibe la autoadministración oral de ETOH, lo que sugiere que el sistema cerebral CAT- $H_2O_2$ , y la formación central de ACD, juegan un papel clave en los efectos motivacionales de ETOH (Peana y cols, 2013).

Numerosas líneas y evidencias sugieren que para generar tanto la recompensa como el esfuerzo, el ETOH debe ser metabolizado a ACD a nivel cerebral (Karahanian y cols, 2011; Peana y cols, 2013). En este sentido se ha demostrado, como se detalló anteriormente que mediante la inhibición de su generación en cerebro, ya sea mediante la utilización de agentes secuestrantes o aumentando su degradación (Cannizaro y cols, 2010; Corres y cols, 2012; Fuentes y cols, 2006a, b), algunos de los efectos

farmacológicos atribuibles al ETOH son reducidos de manera significativa. Además se ha comprobado, que este primer metabolito posee por sí mismo propiedades de refuerzo, apoyando de este modo como vimos la participación activa del ACD en la adicción del ETOH (Cacace y cols, 2012; McBride y cols, 2002; Peana y cols, 2010; Quertemont y cols, 2005).

Varios estudios han demostrado que el ACD induce autoadministración de ETOH por diferentes vías, ya sea endovenosa (Brown y cols, 1979; Myers y cols, 1982; Takayama y Uyeno, 1985), en VTA e i.c.v. (McBride y cols, 2002; Rodd-Henricks y cols, 2002; Aragón y cols, 1991; Aragón y Amit, 1992; Zimatkin y cols, 1998). Curiosamente Peana y cols (Peana y cols, 2010) demostraron por primera vez, que el ACD presenta la propiedad de ser autoadministrado por vía oral en ratas. Estos resultados apoyan la hipótesis novedosa y controversial que sostiene que el ACD periférico también tendría propiedades reforzantes (Deehan y cols, 2013). Sin embargo, éstas se encuentran dentro de una ventana limitada de concentración de ACD en la solución puesto que se observó que a determinadas dosis induce autoadministración, mientras que fuera del rango de las mismas ésta no se manifiesta (Correa y cols, 2012).

En relación a este postulado, la utilización de un agente secuestrante del ACD (D-penicilamina) y un inhibidor de la CAT (AT) en un paradigma de autoadministración han demostrado una vez más la implicancia del metabolismo del ETOH y de la formación del ACD en los efectos reforzantes del mismo. Estos compuestos fueron capaces de inhibir la adquisición de la autoadministración de ETOH en ratas no así el mantenimiento de la conducta. Al respecto, los autores sugieren que el ACD cerebral podría estar participando activamente en la formación del aprendizaje pavloviano provocado por el ETOH durante la etapa de adquisición de la autoadministración, mientras que durante la fase de mantenimiento de la conducta la contribución del ACD estaría mediada por un mecanismo combinado con otros factores (Peana y cols, 2015).

Estos hallazgos resaltan la importancia del proceso metabólico del ETOH y la generación del ACD en las propiedades motivacionales de la droga que puede redundar en nuevas estrategias farmacológicas para reducir el consumo de ETOH.

En resumen, la utilización de procedimientos de condicionamiento operante para estudiar el comportamiento de la autoadministración de ETOH brinda mayor información que los modelos de consumo de ETOH de libre elección. En primer lugar, este enfoque permite un análisis por separado de los componentes apetitivos (búsqueda) y de los consumatorios (ingesta) de la conducta de autoadministración. Si bien la cantidad de ETOH consumido es una variable común dependiente a todos los modelos de autoadministración, el estudio del componente apetitivo ofrece una oportunidad para examinar los efectos motivacionales de ETOH (es decir, hasta qué punto está dispuesto a trabajar el animal para tener acceso a ETOH). Además, la manipulación sistemática de dosis (por ejemplo, concentración de ETOH), así como el programa de reforzamiento (es decir, aumentando el requisito de respuesta utilizando los procedimientos de relación progresiva) permiten un análisis más detallado de la eficacia del refuerzo hacia el ETOH. El seguimiento de la distribución y el patrón de respuesta también proporcionan un análisis más refinado de los factores que influyen en el comportamiento de autoadministración. Por último, la medición de la respuesta de comportamiento, el tiempo de espera para la entrega de ETOH (extinción de responder) proporciona también un medio para definir operacionalmente el comportamiento de búsqueda de ETOH. Sin embargo, presenta la limitación del extenso período de entrenamiento al cual deben someterse a los animales y el bajo porcentaje de animales que adquieren la conducta así como la reducida ingesta de ETOH puesto que éste es entregado en gotas de 10  $\mu$ l, lo que dificulta que se alcancen alcoholemias farmacológicamente relevantes.

*Basándonos en resultados previos (sección II) y las evidencias teóricas presentadas, esperaríamos que al igual que con el paradigma de consumo voluntario de ETOH, los animales expuestos a Pb presenten una mayor autoadministración de ETOH en relación a sus respectivos controles.*



Considerando las ventajas y limitaciones de esta prueba el OBJETIVO de este capítulo fue evaluar la conducta de autoadministración de ETOH en cajas de Skinner usando el modelo de condicionamiento operante en animales C y expuestos al Pb. Se evaluó además diferentes manipulaciones farmacológicas inhibiendo con AT o potenciando con 3NPA la actividad de CAT. Así, se intentó evidenciar y reproducir las diferencias entre grupos reportadas para la prueba de consumo voluntario de ETOH además de aportar mayores evidencias a la participación del ACD en esta conducta.

## Materiales y Métodos:

### *Autoadministración de ETOH*

Se usaron 10 cajas de Skinner (Med-Associates, Inc.) ubicadas dentro de cubículos de aislamiento para mitigar el sonido exterior. Las mismas se encuentran equipadas con 2 palancas fijas (una activa y otra una inactiva) asociadas cada una a una luz que se enciende luego de que el animal presiona la palanca, además de otra luz accesoria que le provee iluminación a la caja durante el experimento. La recompensa (alimento o droga líquida) es entregada mediante receptáculos de pellets, de líquidos o una cánula que está conectada a una jeringa, respectivamente. Como consecuencia de la presión del animal sobre la palanca activa el animal recibe en forma oral (una gota de 10  $\mu$ l de una solución líquida de distintas concentraciones de ETOH). El control de las cajas de Skinner y la adquisición de los datos son realizados mediante programas de computación provistos por el fabricante, que incluye gráficos y tablas de registros acumulados que pueden ser exportados a planillas Excel.

Para este experimento se siguió el protocolo de Samson (Samson y cols 1998) con ligeras modificaciones. Los animales en primer lugar, fueron entrenados para la adquisición de la conducta de palanqueo para lo cual fueron restringidos de alimento hasta llegar al 80% de su peso a fin de aumentar la motivación por los pellets de comida (fase de “*shaping*”). Como criterio se estableció un máximo de 51 palanqueos a FR1 por sesión de shapping. Una vez que el criterio de palanqueo fue adquirido con la obtención de 50 pellets por dos días consecutivos en sesiones de 12 hs bajo una escala de razón fija 1 FR1 (un palanqueo= entrega de 1 pellet), se comenzó con el esquema denominado “*fading*”. Consistió en sesiones de 30 min diarias con la presentación de soluciones

decrecientes de sucrosa y crecientes de ETOH (%Sucrosa/%ETOH) de acuerdo al siguiente esquema: 2 sesiones 8%/2% ETOH; 2 sesiones 5%/2%; 2 sesiones 10%/10%; 2 sesiones 5%/10% y 5 sesiones 2%/10%). Se procedió entonces a iniciar el protocolo de autoadministración de la droga que consistió en ofrecer una solución al 10% v/v de ETOH, en sesiones diarias de 30 min en las cuales se fue aumentando progresivamente el requerimiento de palanqueo: 10 sesiones asociadas a FR1, 5 sesiones a FR2, 5 sesiones a FR5, 5 sesiones a FR10 y 2 sesiones a FR20. El “punto de quiebre” (*break point*) fue definido como el número máximo de palanqueos que realizó el animal para obtener la droga, y refleja la compulsión por el consumo de la misma. Este protocolo, se utiliza para cuantificar el valor reforzante de la droga que es autoadministrada y consiste en aumentar de manera progresiva el número de respuestas requeridas para la obtención de la recompensa, ya sea en una misma sesión o en varias sesiones. En el caso del ETOH, como consecuencia de sus propiedades farmacológicas bifásicas de estimulación a dosis bajas, ansiólisis a dosis intermedias y sedación a altas dosis, se efectúa este procedimiento en sesiones diarias consecutivas (Depoortere y cols, 1993; Hecht y cols, 1998; Hodos y cols, 1961). De esta manera se determina cuál es el punto de quiebre o *break point*, que coincide con el máximo esfuerzo que está dispuesto a realizar el animal para obtener la infusión de la droga, es decir el número máximo de respuestas posibles antes de que la conducta se extinga (Roberts y cols, 1989). Es por lo tanto un reflejo de la motivación que tiene el animal por obtener la droga.

En la figura 48 se muestra el esquema empleado para su determinación.

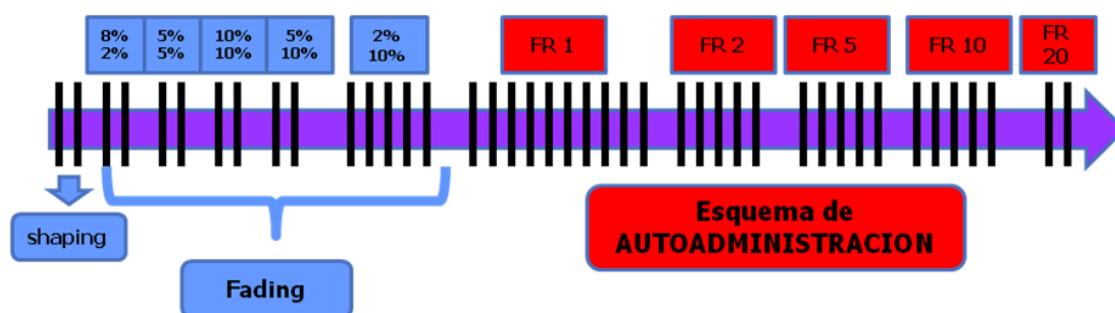


Figura 48: Esquema de autoadministración empleado para determinar el punto de quiebre. Fases de *shaping* (sesiones de 12 hs con pellets de alimento), de *fading* (sesiones de 30 min, con dosis decrecientes de sucrosa y crecientes de ETOH) y de *autoadministración de ETOH* (sesiones de 30 min con ETOH al 10% asociado a un aumento progresivo del número de palanqueos de razón fija).

### Manipulaciones farmacológicas: administración de AT y 3NPA

Una vez que se determinó la razón de palanqueo más adecuada a la cual se evidenciaron mejor las diferencias entre grupos para la autoadministración de ETOH, se procedió a realizar las manipulaciones farmacológicas correspondientes. A un grupo de animales se les administró durante 4 días, AT a una dosis de 250 mg/kg i.p, 5 horas previas al inicio de la sesión de 30 min, mientras que un segundo grupo fue inyectado con 3NPA 20 mg/kg s.c. 30 min antes de la sesión de autoadministración (figura 49).

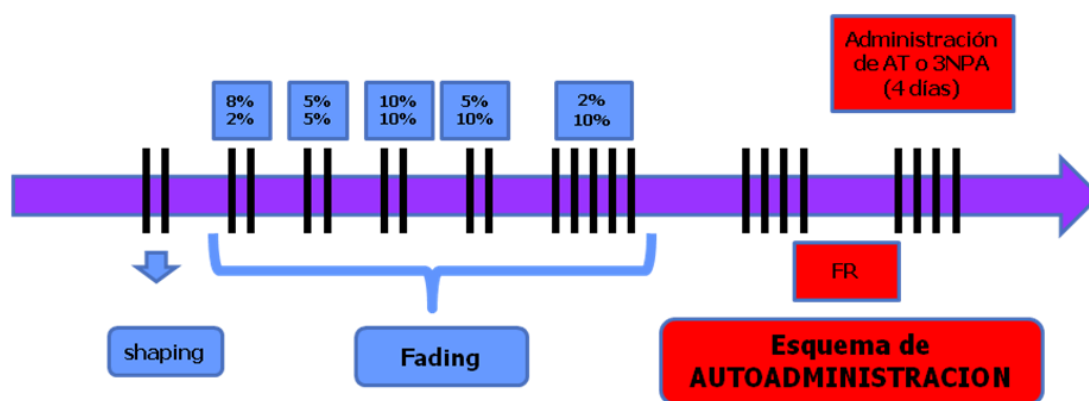


Figura 49: Esquema de administración de AT y 3NPA.

### Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó, en el caso de la determinación del *break point* y la determinación de la razón de palanqueo más adecuada a la cual se evidencien mejor las diferencias entre grupos para la autoadministración de ETOH, con un ANOVA de dos vías de medidas repetidas considerando como variable grupo y sesiones de radio fijo (FR) como la variable repetida. En el *shaping* y *fading*, también los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, con la variable grupo frente a la sesión de *shaping* como la variable repetida en el primer caso, mientras que en el *fading* la variable grupo frente a la sesión de *fading* como la variable repetida.

En tanto en las manipulaciones farmacológicas con AT y 3NPA, para el *shaping* y *fading* los datos fueron analizados también mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas comparando las variables grupo, palanqueos y sesión de *shaping* en el primer caso y *fading* como la variable repetida en el caso del *fading*, se realizó un análisis tomando cada sesión por separada y luego se analizó uniéndolo mediante bloques las sesiones que presentaban la misma concentración de ETOH y sucrosa. Por último, las

manipulaciones farmacológicas (AT o 3NPA) fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, en las sesiones previas a la administración de las drogas: grupo y sesión de razón fija 2 (FR2) como la variable repetida. Una vez que las drogas fueron administradas los datos fueron analizados con un ANOVA de medidas repetidas de tres vías, grupo y droga contrastando con sesión de razón fija como variable repetida. En ambos casos se realizó un análisis tomando cada sesión por separada y luego se analizó mediante un ANOVA de dos vías (grupo y palanca) uniéndose mediante bloques las sesiones. En todos los casos, cuando se encontró una interacción significativa, se realizó una prueba de Tuckey con el resultado de los valores de  $p$  indicados en las leyendas de las figuras.

## Resultados:

### *Autoadministración de etanol*

Los datos graficados en las figuras 50, 51 y 52 corresponden a la fase de entrenamiento/adquisición de la conducta de palanqueo de los animales (*shaping*), a las sesiones de adquisición de la conducta de ingesta de ETOH con soluciones decrecientes de sucrosa (*fading*) y finalmente a las sesiones diarias de 30 min de duración en las cuales se fue aumentando progresivamente el requerimiento de palanqueo, tanto de animales C como perinatalmente expuestos a Pb.

Shaping: de la observación respectivamente de la figura 50 puede distinguirse que no se evidencian diferencias significativas en las 2 sesiones de *shaping* entre los grupos C y Pb puesto que el número de palanqueos realizados fue similar en ambos grupos.

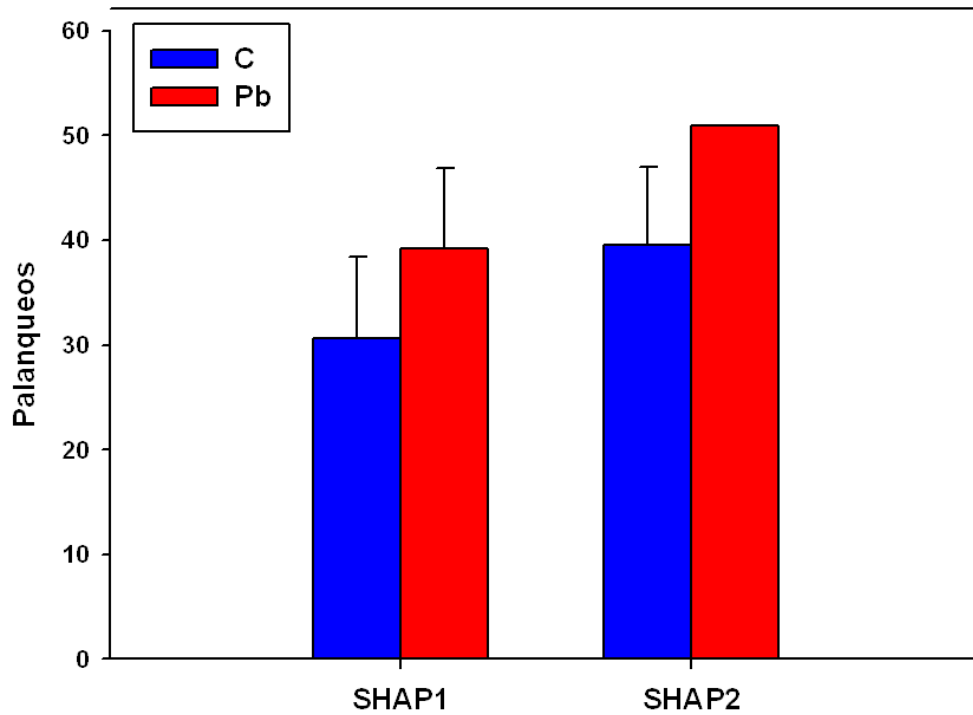


Figura 50: Shaping: adquisición de la conducta de palanqueo con autoadministración de alimentos bajo un FR1 en control y ratas expuestas a Pb. La media de las respuestas por sesión (2 sesiones en total). No se observan diferencias entre ambos grupos ni entre sesiones. Durante el shapping 2 (SHAP2) la barra representativa del grupo Pb no presenta error estándar como consecuencia de que todos los animales en esta sesión llegaron al requerimiento previsto que fue establecido como 51 palanqueos.

Fading: tal como se observa en la figura 51, los resultados del ANOVA para medidas repetidas revelaron un efecto significativo de la variable repetida (sesión de *fading*):  $F(12,168)=2,33; p<0,01$ .

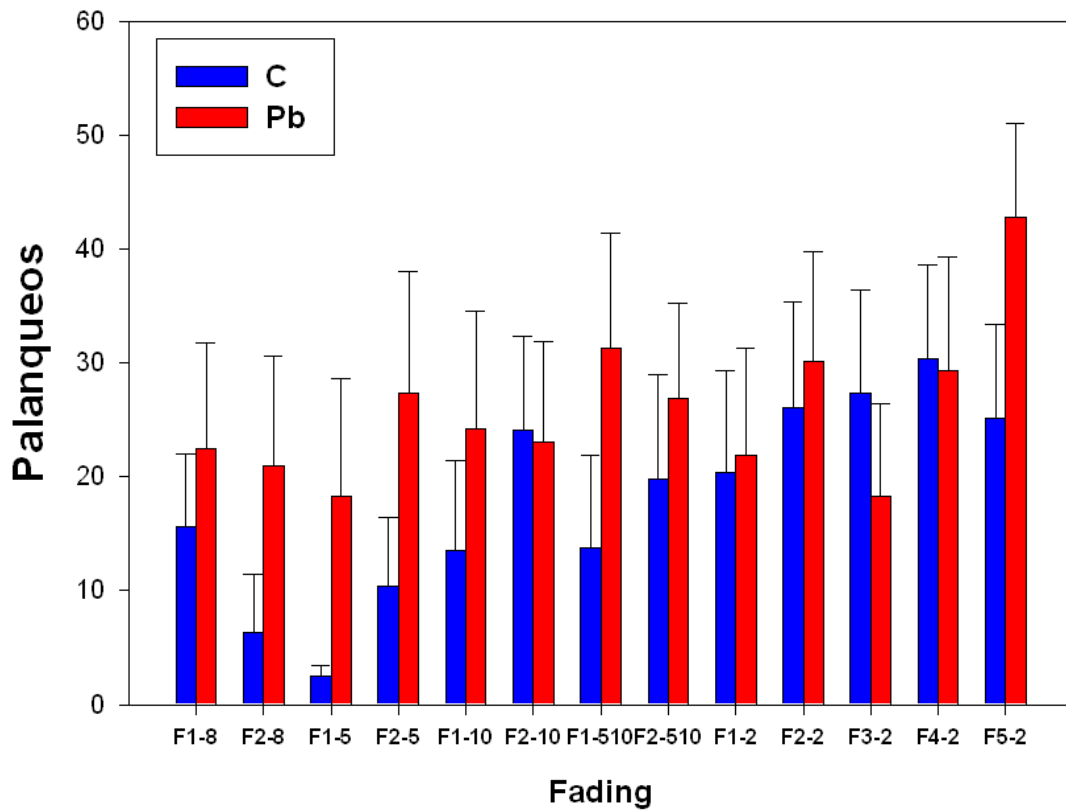


Figura 51: Fading: Adquisición de autoadministración de ETOH a través de soluciones decrecientes de sucrosa y crecientes de ETOH. La media de las respuestas por sesión (13 sesiones en total). No se observan diferencias entre ambos grupos ni entre sesiones.

Determinación del Break point o punto de quiebre: la figura 52 representa las sesiones diarias las que se fue aumentando progresivamente el requerimiento de palanqueo. El análisis estadístico reveló un efecto significativo de grupo (C vs Pb):  $F(1,378)=6,2373$ ;  $p<0,02$ , una diferencia significativa de la variable repetida (FR):  $F(27,378)=3,974$ ;  $p=0,0001$  y una interacción significativa entre grupo y la variable repetida:  $F(27,378)=2,371$ ,  $p<0,0002$ .

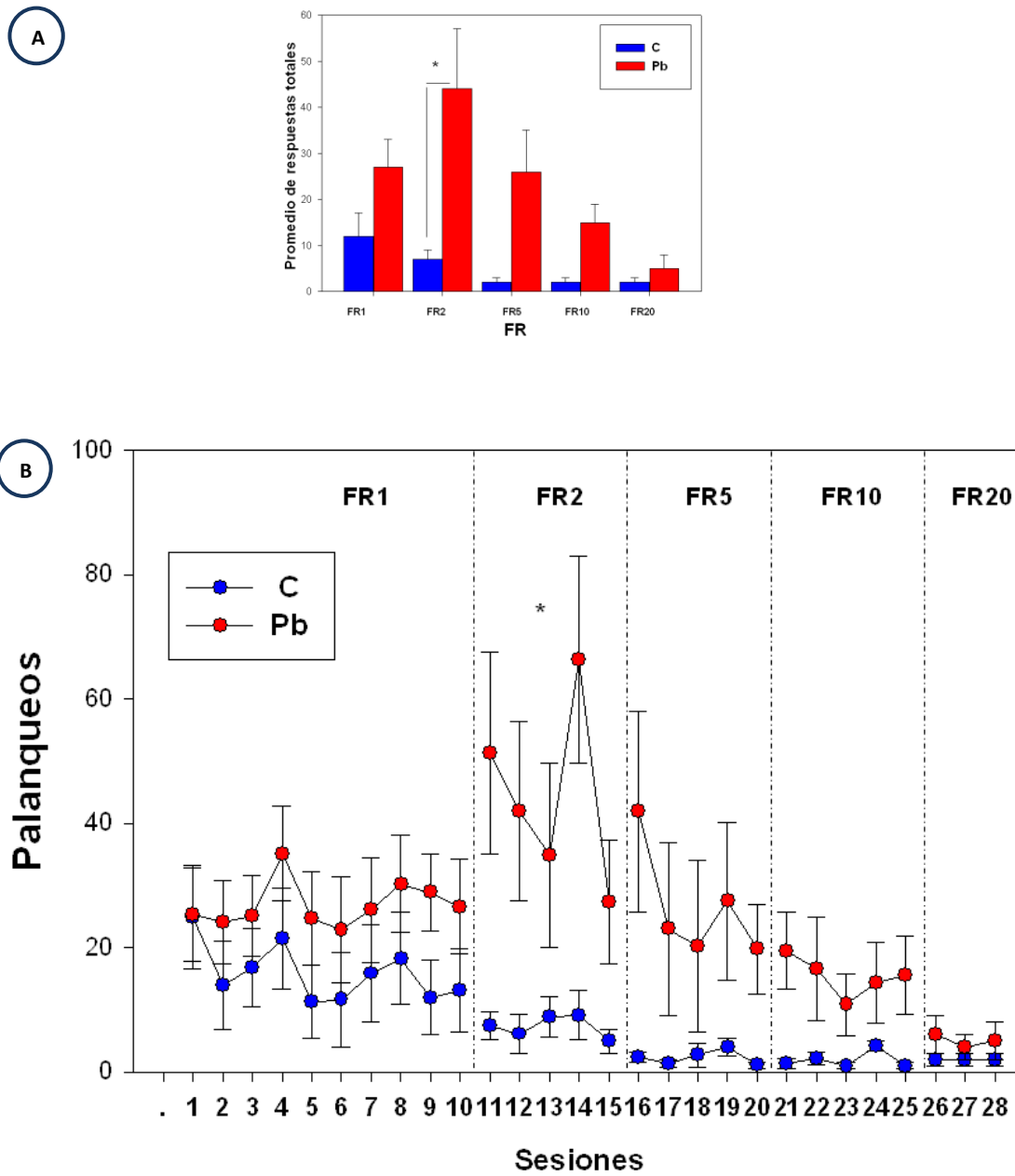


Figura 52: Adquisición oral de 10% de ETOH bajo un programa de reforzamiento de FR progresivo a través de sesiones diarias de 30 min en animales controles y expuestos a Pb. 10 A) La media promedio de palanqueos obtenido en las sesiones para cada FR. B). La media de respuestas por sesión (28 sesiones en total) en la palanca activa asociada a la adquisición de ETOH. El gráfico muestra los efectos de la escalada el requisito de trabajo para el ETOH (FR1 aumentó a FR2, FR5, FR10 y FR20). \* indica  $p < 0,02$  en relación con todas las barras. Animales expuestos a Pb presentan un incremento de la autoadministración de ETOH (en relación con los C) que fue estadísticamente significativo en FR2 y muestra una tendencia a FR5 y 10. Los datos (media + SE) representan  $n=8$  animales por grupo (C y Pb).

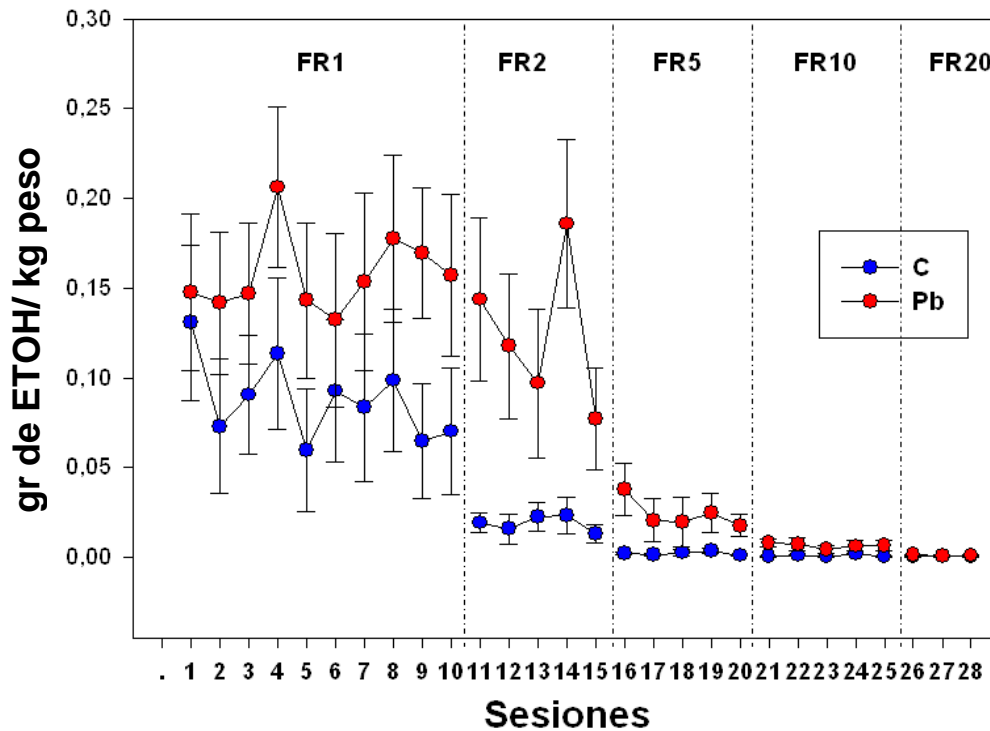


Figura 53: Cantidad de ETOH en gr de ETO/Kg peso ingerido por los animales durante las sesiones diarias de programa de reforzamiento de FR progresivo (FR1, FR2, FR5, FR10 y FR20). Los valores se obtuvieron calculando el volumen de ETOH ofrecido por el pocillo 10 $\mu$ l por la cantidad de palanqueos efectuados por los animales en cada sesión.

### *Manipulaciones farmacológicas: administración de AT y 3NPA*

Los datos graficados en las figuras 54, 55 y 56 corresponden a la fase de entrenamiento/adquisición de la conducta de palanqueo de los animales (*shaping*), a las sesiones de adquisición de la conducta de ingesta de ETOH con soluciones decrecientes de sucrosa (*fading*) y finalmente a las sesiones diarias de 30 min de duración a FR2 previo al tratamiento con AT y 3NPA (4 sesiones en total) y luego de la administración de las drogas (4 sesiones en total), tanto de animales C y perinatalmente expuestos a Pb.

Shaping: en la figura 54 puede distinguirse que el análisis del ANOVA de tres vías (grupo, palanqueos y sesión de shaping) se evidencia diferencias significativas en la variable palanqueos  $F(1,94)= 178,79; p<0,0001$ , de la variable repetida  $F(2,118)= 29,52; p<0,0001$  y de la intercepción entre la variable sesión de shaping x palanqueos  $F(2,118)= 39,18; p<0,0001$



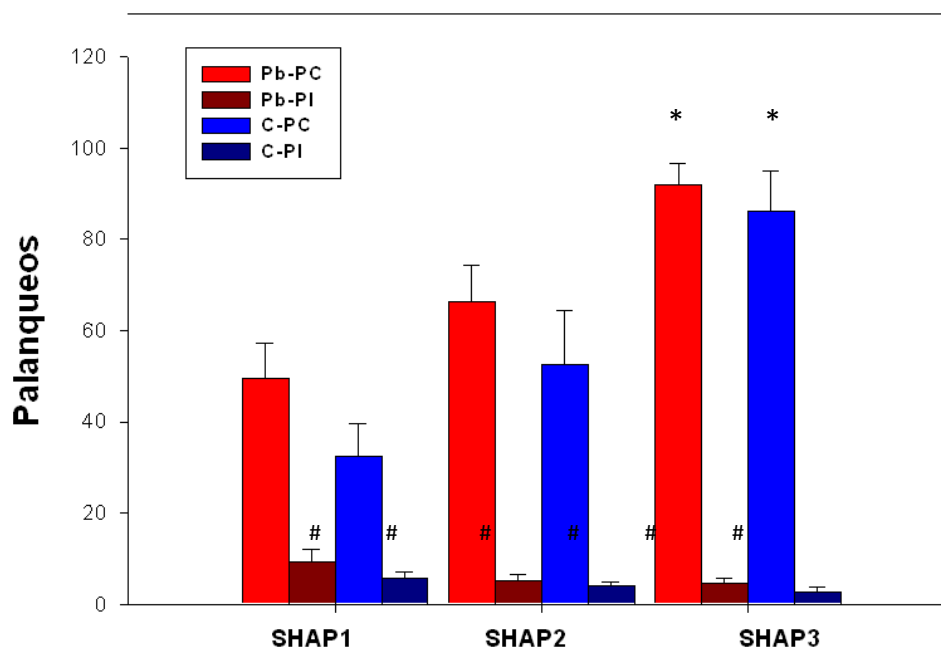
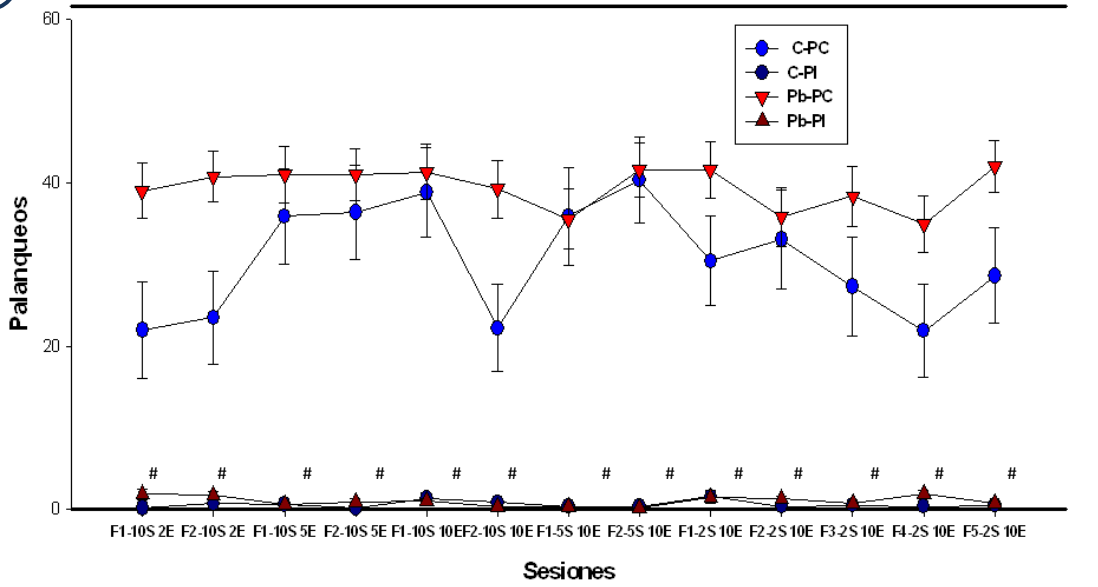


Figura 54: Consumo de alimento bajo un FR1 en animales controles y ratas expuestas a Pb (*Shaping*). La media de las respuestas por sesión (3 sesiones en total). PC= palanca correcta y PI= palanca incorrecta. Denota #  $p < 0,0001$  (Pb palanca correcta vs Pb palanca incorrecta, C palanca correcta vs C palanca incorrecta). \* $p < 0,001$  (Pb shap 1 vs Pb Shap 3, Cshap1 vs C shap3) Pb=33 C=16 animales por grupo.

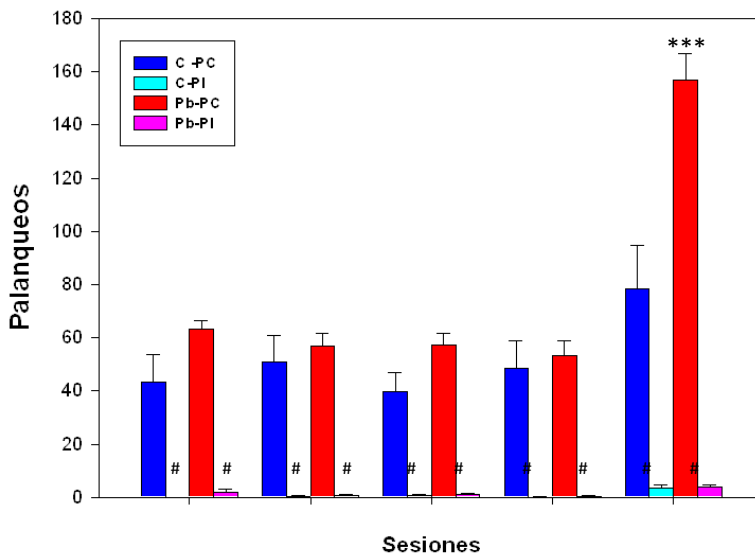
Fading: con respecto, a las sesiones de adquisición de la ingesta de ETOH con dosis decrecientes de sucrosa y crecientes de ETOH tal como se observa en la figura 55 A) y B). Los resultados del ANOVA para medidas repetidas de tres vías para las sesiones tomadas por separado revelaron un efecto significativo de la variable grupo  $F(1,93)=5,54$ ;  $p < 0,05$ , palanqueos  $F(1,93)=412,49$ ;  $p < 0,0001$ , la variable repetida (sesión de *fading*):  $F(12,1116)=2,03$ ;  $p < 0,02$  y de la intersección entre la variable repetida x palanqueos  $F(12,1116)=2,56$ ;  $p < 0,01$ , de la variable repetida x grupo  $F(12,1116)=2,37$ ;  $p < 0,005$  y de la variable repetida x grupo x palanqueos  $F(12,1116)=2,11$ ;  $p < 0,01$ . Mientras que el análisis por bloques reveló un efecto significativo de la variable grupo  $F(1,70)=10,5$ ;  $p < 0,002$ , palanqueos  $F(1,70)=240,1$ ;  $p < 0,0001$ , de la intersección grupo x palanqueos  $F(1,70)=8,2$ ;  $p < 0,005$ , la variable repetida (sesión de *fading*):  $F(4,280)=39,02$ ;  $p < 0,0001$  y de la intersección entre la variable repetida x palanqueos

$F(4,280)=32,62; p<0,0001$ , de la variable repetida x grupo  $F(4,280)=9,46; p<0,0001$  y de la variable repetida x grupo x palanqueos  $F(4,280)=9,49; p<0,0001$ .

A



B



**Figura 55: Adquisición de sucrosa y ETOH (Fading).** A) Representado en sesiones separadas. La media de las respuestas por sesión (13 sesiones en total). Denota #  $p < 0,0001$  (Pb palanca correcta vs Pb palanca incorrecta, C palanca correcta vs C palanca incorrecta). B) Unido en bloques de sesiones correspondientes a la misma concentración de ETOH y sucrosa. Denota #  $p < 0,0001$  (Pb palanca correcta vs Pb palanca incorrecta, C palanca correcta vs C palanca incorrecta), \* Indica diferencias entre grupos \*\*\*  $p < 0,0002$  (Pb palanca correcta vs C palanca correcta).

Adquisición de autoadministración de ETOH: en la figura 56, pueden observarse los datos correspondientes a las sesiones de autoadministración de ETOH bajo FR1 (10 sesiones en total). El análisis del ANOVA para sesiones por separado revela una diferencia significativa para la variable palanqueo:  $F(1,94)=10,58$ ;  $p < 0,001$ , grupo:  $F(1,94)=8,58$ ;  $p < 0,005$ , palanqueo x grupo:  $F(1,94)=7,24$ ;  $p < 0,01$ , de la variable repetida:  $F(9,846)=3,22$ ;  $p < 0,001$  y de la intersección entre la variable repetida x palanqueo:  $F(9,846)=3,20$ ;  $p < 0,001$ . Mientras que para las sesiones consideradas por bloque revela una diferencia significativa para la variable palanqueo:  $F(1,70)=80,5$ ;  $p < 0,0001$ , grupo:  $F(1,70)=12,89$ ;  $p < 0,001$ , palanqueo x grupo:  $F(1,70)=11,67$ ;  $p < 0,001$ .

Administración de AT y 3NPA (Basal): en las figuras 57 y 58 se encuentran representadas las sesiones previas (4 sesiones en total bajo un FR2, en donde se evidencia la mayor diferencia significativa entre grupos) y luego de la administración de los tratamientos con SAL, AT o 3NPA (4 sesiones en total para cada una de las drogas). El análisis estadístico reveló (figura 57B) en las sesiones previas a la administración de las drogas (en el análisis de los grupos por separado SAL/AT/3NPA) un efecto significativo de grupo (C vs Pb):  $F(1,94)=10,58$ ;  $p < 0,001$  pero no se observó una diferencia significativa ni en la variable repetida ni en la interacción entre ambas. Mientras que cuando se analizaron los grupos sin ser separado previamente, figura 57 A) el análisis estadístico reveló una diferencia significativa de palanqueo:  $F(1,94)=65,06$ ;  $p < 0,0001$ , grupo:  $F(1,94)=24,74$ ;  $p < 0,001$  y de la interacción grupo x palanqueo:  $F(1,94)=22,96$ ;  $p < 0,001$ . En tanto que el análisis estadístico en sesiones unidas por bloques reveló únicamente una diferencia significativa de la variable grupo  $F(1,68)=6,6$ ;  $p < 0,01$

Administración de AT y 3NPA: en la figura 58 se pueden observar las sesiones tras la administración previa ya sea de SAL, AT o 3NPA. El análisis del ANOVA de tres vías reveló únicamente una diferencia significativa en la variable droga:  $F(2,92)=3,98$ ;

$p < 0,02$ . En tanto que el análisis estadístico en sesiones unidas por bloques reveló únicamente una diferencia significativa de la variable grupo  $F(2,68)=4,49$ ;  $p < 0,05$ .

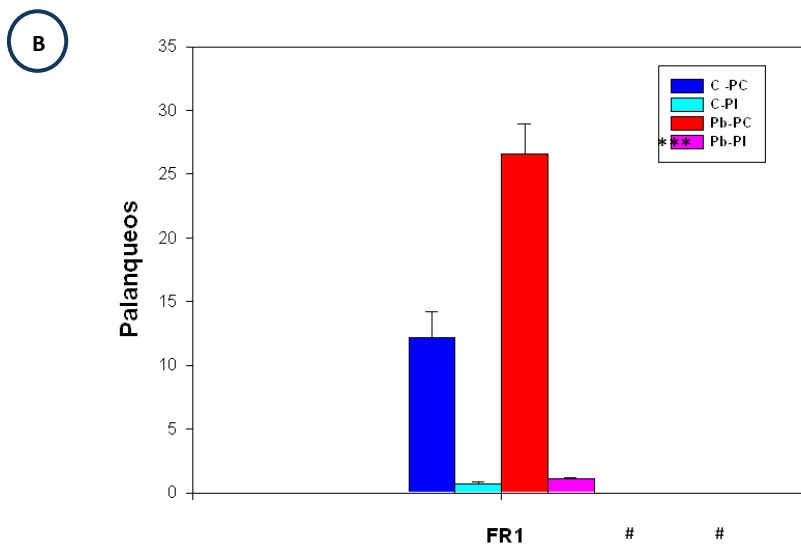
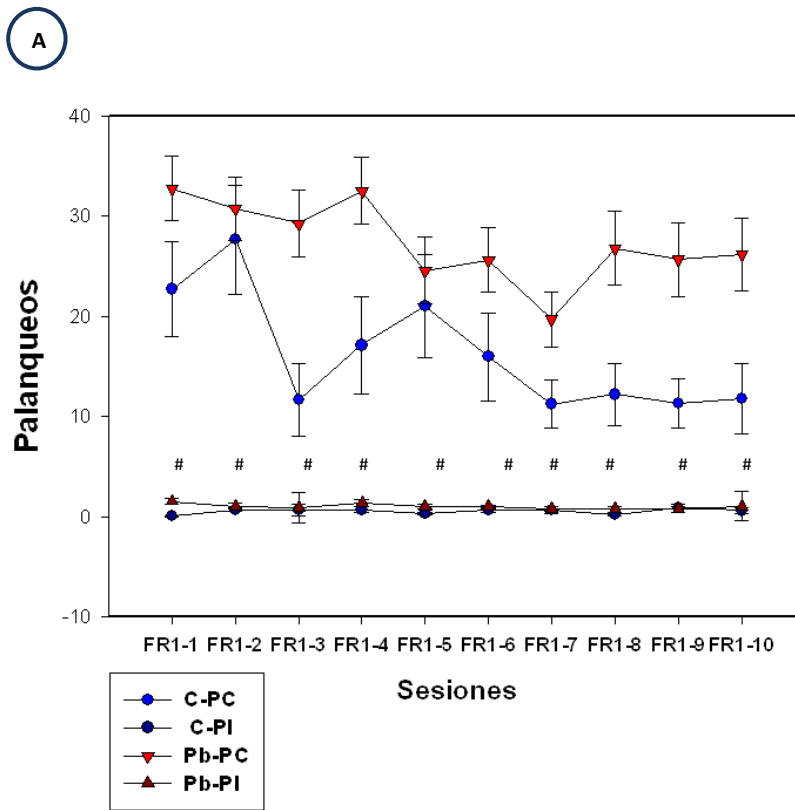
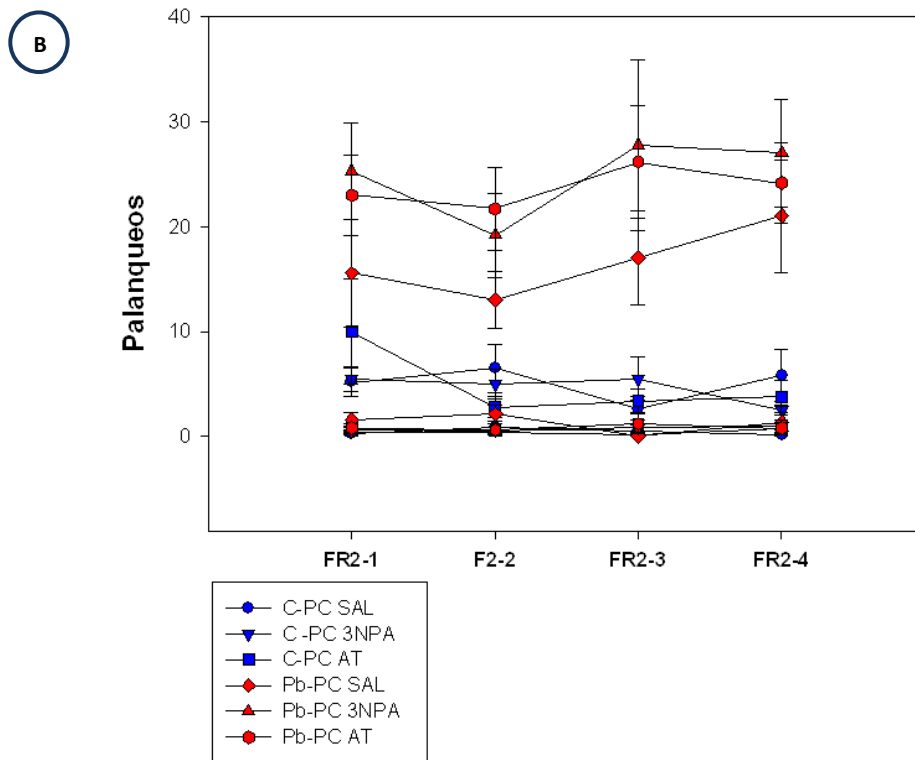
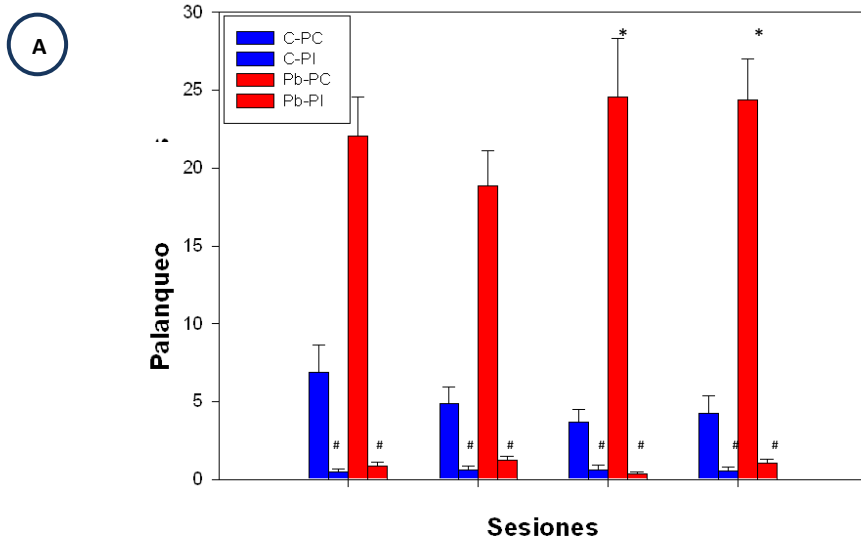


Figura 56: Autoadministración de ETOH bajo FR1 en animales control y ratas expuestas a Pb. A) Representado en sesiones separadas. La media de las respuestas por sesión (10 sesiones en total). Denota #

$p < 0,0001$  (Pb correcta vs Pb incorrecta, C correcta vs C incorrecta). B) Unido en bloques. Denota #  $p < 0,0001$  (Pb palanca correcta vs Pb palanca incorrecta, C palanca correcta vs C palanca incorrecta), \* indica diferencias entre grupos \*\*\* #  $p < 0,0001$  (Pb correcta vs C coorrecta).



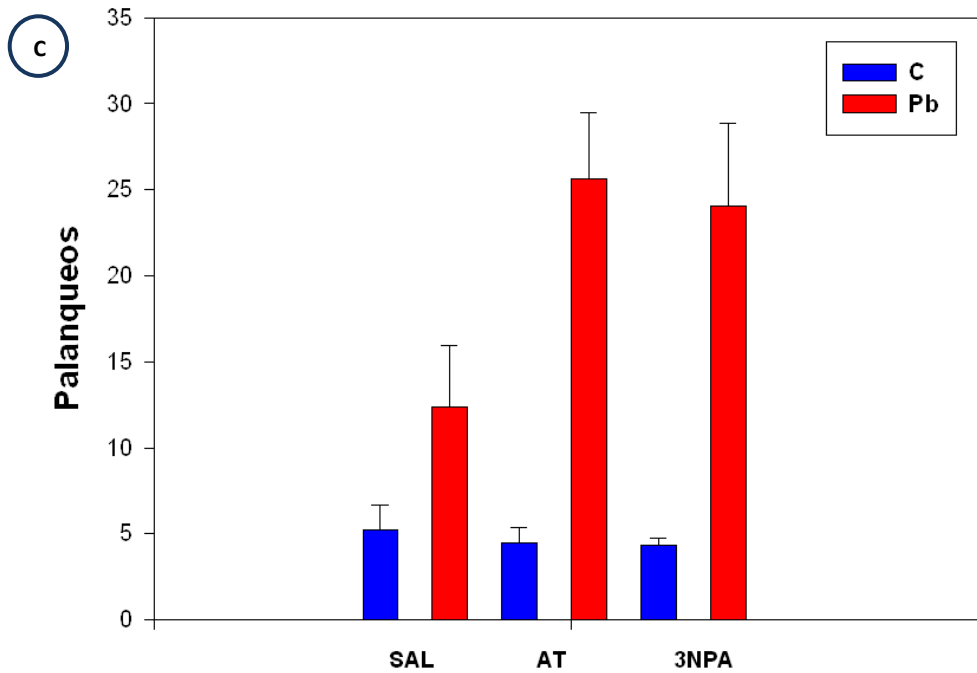


Figura 57: Autoadministración de ETOH bajo FR2 en animales control y ratas expuestas a Pb. A) y B) Representado en sesiones separadas. Media de las respuestas por sesión (4 sesiones en total). A) Denota \*  $p < 0,001$  (Pb AT vs C AT) Figura A (Arriba) Indica #  $p < 0,001$  (Pb palanca correcta vs Pb incorrecta, C palanca correcta vs C palanca incorrecta), \*  $p < 0,05$  (Pb palanca correcta vs C palanca correcta). C) Unido en bloques. CSAL = 6 CAT = 5 C3NP = 5 Pb SAL = 9 Pb AT = 13 Pb 3NP = 11 animales por grupo. C = 16 Pb = 33 animales.

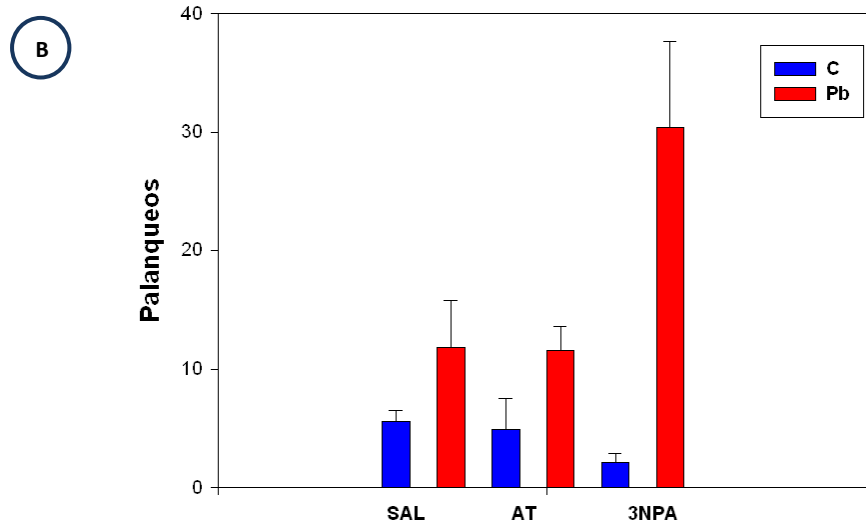
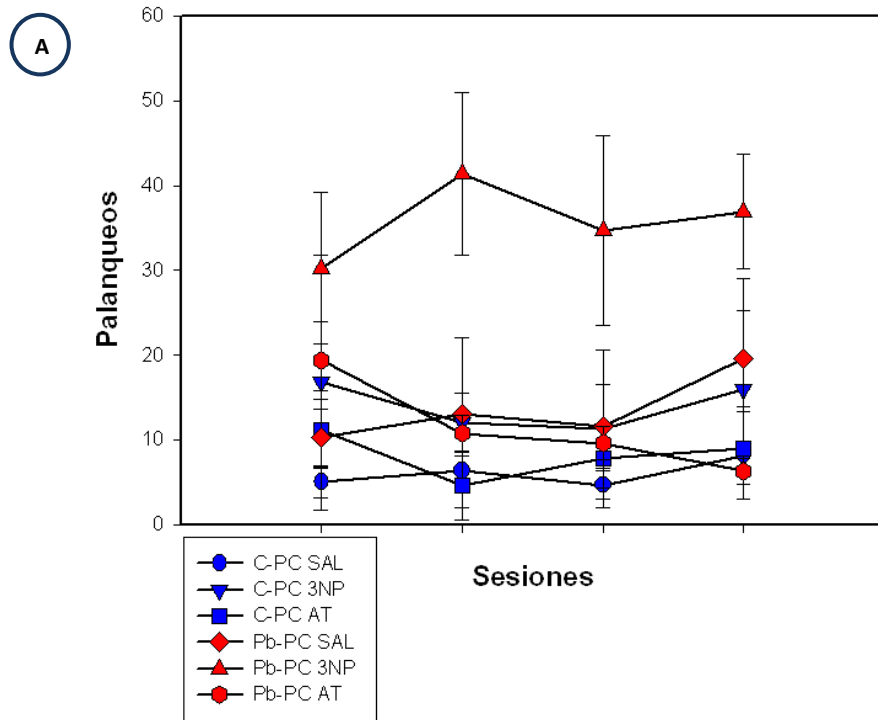


Figura 58: Autoadministración de ETOH bajo FR2 ratas controles y expuestas a Pb, ambos grupos fueron inyectados con SAL, 3NP o AT. A) Representado en sesiones separadas. Media de las respuestas por sesión (4 sesiones total). A) Unido en bloques.

## Discusión

Los resultados obtenidos proporcionan, por una parte nuevas evidencias de una mayor sensibilidad a las propiedades motivacionales de ETOH en ratas expuestas perinatalmente a Pb, lo cual se reflejó como una mayor autoadministración de ETOH a FR2 (razón fija 2, 2 palanqueos= 1 entrega de ETOH) en el paradigma de conducta operante. Por otra parte, aportan evidencias adicionales de la participación de CAT, lo cual se evidenció a través del efecto de las manipulaciones farmacológicas (principalmente 3NPA) sobre la conducta operante.

Considerando el modelo experimental, Green y Grahame analizando trabajos en donde se emplearon distintas cepas de ratones y ratas que presentan una preferencia diferencial al ETOH como resultado de modificaciones genéticas (Green y Grahame, 2008), observaron una correlación consistente y positiva entre el consumo voluntario de ETOH y la conducta operante en cajas de Skinner, lo cual sugiere que la conducta instrumental está estrechamente relacionada a nivel genético con la conducta consumatoria y apetitiva del ETOH. Al respecto, en nuestro modelo animal evidenciamos un paralelismo positivo entre el paradigma de libre elección (consumo de ETOH/agua) y la autoadministración oral de ETOH, observando en ambos una mayor administración de ETOH en el grupo Pb en relación con los controles.

Basados en el concepto de condicionamiento instrumental acuñado por Skinner (Skinner, 1938), los animales para poder realizar el presente paradigma experimental tuvieron que adquirir la conducta de autoadministración, es decir aprender como tarea a accionar una palanca. Esto es importante para descartar posibles deficiencias en el aprendizaje de la conducta operante, tarea que se realizó con el mismo protocolo con un reforzador natural, como es la comida. Teniendo en cuenta que el Pb, es un importante neurotóxico del desarrollo y que a bajas dosis se ha observado que produce déficit atencional y problemas de aprendizaje en niños resulta sumamente pertinente la evaluación de esta conducta en estos animales. Como puede observarse, los animales no manifestaron ningún déficit de aprendizaje lo cual fue evidente en ambas sesiones de *shaping* (para determinar el punto de quiebre y para las manipulaciones farmacológicas) en donde no se observaron diferencias en relación a la cantidad de palanqueos con respecto a los animales C y cuando se evaluó, la cantidad de palanqueos de la palanca activa/inactiva los animales fueron capaces de diferenciar correctamente entre ambas (manifestándose en ambos grupos una tasa baja de palanqueos de la palanca inactiva en todas las sesiones de *shaping*).



Durante la etapa de adquisición y mantenimiento de la conducta el animal ya ha aprendido los efectos reforzantes que posee la droga y cuál es la respuesta que se requiere para su presentación. Al aumentar el valor de la razón fija requerida para la obtención de un esfuerzo, se incrementará el esfuerzo que el animal debe realizar para obtener la droga, y de esta forma se estará eliminando sesgos de comportamiento inespecífico. De allí la importancia de determinar el punto de quiebre o "*break point*", es decir el máximo esfuerzo que está dispuesto a realizar el animal para obtener ETOH. Como puede observarse en el caso de los animales expuestos a Pb, este punto de quiebre se observó a una razón fija de 5 (5 palanqueos=1 esfuerzo) al igual que en los C. Mientras que la razón fija de 2 (FR2) se evidenció de manera estadísticamente significativa una mayor autoadministración de ETOH en los animales Pb en relación a los controles. Si bien puede observarse, que a lo largo de todas las sesiones (de FR1 a FR20) existe una tendencia de mayor autoadministración de ETOH en los animales expuestos a Pb en relación a los controles, los cuales mantuvieron una tasa relativamente baja y estable de autoadministración a lo largo de todo el experimento. A la razón fija de 10 y 20 (FR10-FR20) puede observarse como en los animales expuestos a Pb, se produce una disminución importante en la tasa de palanqueos para obtener ETOH. En relación a esto y tal como se ha propuesto y explicado con anterioridad (Samson y cols, 2000) el ETOH en realidad sería en comparación con otras drogas de abuso un reforzador débil, lo cual concuerda con nuestros resultados en donde la tasa de esfuerzo/palanqueos que el animal está dispuesto a realizar para obtener la droga es relativamente baja (FR2) comparado con otras drogas como cocaína.

En relación a las propiedades farmacológicas del ETOH, es importante destacar que tal como se observa en la figura 53, la concentración de ETOH que alcanzaron los animales expuestos a Pb en las sesiones, si bien más elevados que sus respectivos C fueron bajos. Al respecto, algunos autores han propuesto la utilización como modelo para determinar la vulnerabilidad de los animales a determinadas drogas, exponer a los animales a dosis muy bajas de la misma lo que conllevarían a que se obtengan valores en sangre de la droga bajos, con lo cual solamente los animales más sensibles desarrollarían una conducta de autoadministración (Piazza y Le Moal, 1996, Piazza y cols, 2000). Por ejemplo, el ofrecimiento a roedores de bajas dosis de drogas, solamente fue capaz de inducir en determinados individuos más sensibles la conducta de autoadministración de drogas intravenosas (Piazza y cols, 1989). Por lo tanto, es posible que la exposición perinatal a Pb produzca el desarrollo de una mayor vulnerabilidad y sensibilidad a las

propiedades motivacionales de ETOH lo cual se evidencia con una mayor autoadministración en estos animales aun cuando los niveles de ETOH que se alcanzan en sangre son relativamente bajos.

Por ultimo en relación a las manipulaciones farmacológicas, puede concluirse que sólo la administración de 3NPA fue capaz de producir un incremento de la autoadministración en relación a los animales inyectados con SAL pero selectivamente en el grupo expuesto a Pb. Esta conducta no se corresponde con lo observado en el consumo voluntario de ETOH en donde el 3NPA fue capaz de producir un incremento de la ingesta de la droga en ambos grupos. Con respecto al AT, no se observó ningún efecto quizás porque la tasa de palanqueo que condiciona a los niveles de ETOH en estos animales no son lo suficientemente elevados como para producir efecto, tal como se observó en el consumo voluntario de ETOH en los animales C. Recordemos que se ha observado que el AT es capaz de reducir el consumo de ETOH en ratas seleccionadas genéticamente por su alto consumo de ETOH (UchB) no así en bajas bebedoras (UchA) (Tampier y cols, 1995).

En resumen, los resultados obtenidos con el paradigma de conducta operante aportan evidencias que apoyan la noción de que los animales expuestos a Pb presentan una mayor susceptibilidad a las propiedades motivacionales de ETOH y que se manifiestan en paralelo con lo obtenido en el paradigma de consumo de ETOH de libre elección. Evidenciándose en ambos paradigmas una mayor autoadministración de ETOH de los animales expuestos a Pb en relación con los controles. Con respecto a los resultados de las manipulaciones farmacológicas, estas proveen mayores evidencias del rol de CAT en estas respuestas si bien, únicamente el 3NPA fue capaz de producir un efecto significativo sobre este tipo de conducta.

*Como conclusión parcial: Los animales expuestos a Pb presentan una mayor susceptibilidad a las propiedades motivacionales de ETOH lo cual se evidencio con una mayor autoadministración de ETOH a FR2 en el paradigma de conducta operante.*

Capítulo V: *“Participación de la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) en los efectos motivacionales del ETOH”.*

## Capítulo V: “Participación de la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) en los efectos motivacionales del ETOH”.

### Marco teórico:

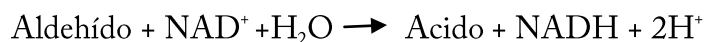
#### *Rol de ALDH2 y su rol en el metabolismo periférico y central del ETOH*

ALDH2 es la enzima responsable de catalizar la oxidación de ACD a ácido acético. Si bien su mayor actividad se encuentra en hígado, también se localiza en otros tejidos como riñón, cerebro y corazón (Deitrich y cols, 1966). Se ha demostrado su presencia en cerebro en diferentes especies de mamíferos tanto en el ser humano (Inque y Lindros, 1982) como en ratas (Korvula y cols, 1981). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que se encuentra ampliamente distribuida en todo el SNC (Zimatkin y cols, 1992; Zimatkin y Lindros, 1996), expresándose en un 40% en el núcleo arcuato hipotalámico y en un 88% en las células cerebrales de Purkinje (Zimatkin y cols, 1992). Interesante resulta el hecho de que su localización contrasta con la de CAT, ya que presenta una baja actividad en los pericariones de neuronas aminérgicas, especialmente las catecolaminérgicas, las cuales como se mencionó con anterioridad son aéreas ricas en CAT, por lo que se propone serían aéreas de mayor acumulación de ACD (Zimatkin y cols, 1995, 1990, 1991).

Numerosos estudios farmacológicos y farmacogenéticos han logrado demostrar que, conductas tales como la locomoción inducida por ETOH, son dependientes y proporcionales a la actividad de CAT cerebral e inversas a la actividad enzimática de la ALDH2, siendo la ALDH2 cerebral y no tanto la hepática la que mejor se correlaciona con este tipo de conductas (Amir y cols, 1977; Socaransky y cols, 1985, Zimatkin y Lindros, 1989; Sinclair y Lindros, 1981; Aragón y Amit, 1985; 1984; Sanchis-Segura y cols, 1999b; Correa y cols, 199b, 2001, 2004b, 2005; Pastor y cols, 2002; Manrique y cols, 2006).

De esta forma, aunque la actividad de ALDH2 en el tejido cerebral comparada con la del hígado es más baja, se ha demostrado que tanto el cerebro humano como el de rata tienen una alta capacidad para oxidar aldehídos, principalmente el ACD formado durante la oxidación del ETOH (Inoue y Lindros, 1982). Por lo tanto, ALDH2 es la enzima responsable y exclusiva tanto a nivel periférico como a nivel central de mediar la

oxidación de ACD a acetato. Es ésta una reacción irreversible que depende de la eficiencia catalítica de la enzima (velocidad máxima  $V_{max}$ , velocidad con la que el sustrato es oxidado), de la capacidad del complejo I de la mitocondria de reoxidación de NADH a  $NAD^+$  (cofactor de la reacción) y de la afinidad por el sustrato ( $K_m$ ):



En relación a su localización subcelular, a diferencia de las otras enzimas implicadas en el metabolismo del ETOH, se encuentra tanto en la fracción microsomal, como en la mitocondrial y citosólica (Deitrich y cols, 1976); sin embargo, es la fracción mitocondrial la que mayor actividad de la enzima presenta siendo la isoenzima involucrada la ALDH2. Al respecto, en la actualidad se han identificado en humanos una superfamilia de 19 genes de ALDH, agupados en tres familias: clase 1 o ALDH1 (baja  $K_m$ , de localización citosólica), clase 2 o ALDH2 y ALDH5 (baja  $K_m$ , de localización mitocondrial) y clase 3 o ALDH3 (alta  $K_m$ ) (Sapag y cols, 2003). Estos genes se localizan en diferentes cromosomas, los cuales codifican un grupo de enzimas que oxidan varios aldehídos aromáticos y alifáticos (Yoshida y cols, 1998). Estas isoenzimas identificadas difieren en sus propiedades cinéticas, que van a influenciar en la velocidad y eficiencia con la cual oxida al ACD. Las múltiples formas moleculares de la ALDH tienen una gran heterogeneidad con respecto a la distribución de tejidos y órganos. ALDH2 presenta un 40% de predominio en el hígado y un 80% en el cerebro (Crabb y cols, 2004; Geenfield y Pietrusko, 1977). Los eritrocitos, contienen bajas cantidades de ALDH2 (Agarwal y cols, 1982a). De todas las isoenzimas que se han identificado genéticamente cabe destacar las formas de ALDH1 y ALDH2. Son moléculas tetraméricas, con subunidades de alrededor de 500 aminoácidos (Jorvall y cols, 1987b). La isoenzima ALDH2 presenta una baja  $K_m$  para el ACD y un valor alto de  $K_m$  para el NAD, y se localiza principalmente a nivel mitocondrial, en tanto que la isoenzima ALDH1, tiene una  $K_m$  relativamente mayor para ACD y una  $K_m$  baja para el NAD y se encuentra mayoritariamente en la fracción citosólica subcelular. En condiciones fisiológicas normales, la ALDH2 que se localiza en la matriz mitocondrial, es la principal responsable de la oxidación del ACD, ya que se encuentra en grandes cantidades y tiene un  $K_m$  bajo para el ACD (Gunnert y cols, 1973; Totmar y cols, 1973; Rikans y cols, 1990). La ALDH citosólica no es muy eficiente para oxidar el ACD, ya que tiene un  $K_m$

elevada para el sustrato y se encuentra en bajas cantidades en cerebro (Deitrich y cols, 1972; Rikans y cols, 1990).

### *Genética del alcoholismo: ALDH y su polimorfismo isoenzimático*

Si bien existen varios factores (culturales, sociales, económicos y étnicos) que influyen y son responsables de diferentes patrones de consumo de ETOH en humanos, numerosas investigaciones indican que, cerca del 50% de la predisposición a abusar del ETOH, sería de origen genético. De esta manera, existen numerosos reportes que demuestran que no todos los individuos tienen la misma predisposición a desarrollar alcoholismo. Se han realizado estudios sobre diferentes poblaciones humanas así como entre gemelos, mellizos y hermanos gemelos entregados en adopción separadamente e hijos de padres alcohólicos (Propping y cols, 1977; Heath y cols, 1995; Sorbel y cols, 1996). En estudios realizados en gemelos, se ha puesto de manifiesto que el alcoholismo puede ser heredado en un 50% o más (Goldman y Enoch, 1990). Así, algunos autores apoyan el hecho de que serían las diferencias farmacogenéticas relacionadas con la capacidad de metabolizar el ETOH, que difieren entre los individuos, las responsables de las diferencias observadas en el uso y abuso del ETOH (Thomasson y cols, 1991). Al respecto, las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo del ETOH, y principalmente en la generación y eliminación del ACD, son el centro de atención debido a que algunas como la ALDH, exhiben una gran heterogeneidad determinada genéticamente a través de distintos tipos de polimorfismos. Por lo que se plantea la hipótesis de que las diferencias individuales y étnicas en el metabolismo del ETOH que se encuentran determinadas genéticamente, serían responsables de los patrones diferenciales de consumo del ETOH en humanos (Von Wartburg y Buhler, 1984; Thomasson y cols, 1991; Higuchi y cols, 1994).

Se han propuesto a CAT, ADH y ALDH2 (figura 59), como marcadores genéticos de la predisposición al abuso del ETOH (Agarwal y Goedde, 1992); sin embargo, las últimas investigaciones han centrado su atención principalmente en CAT y ALDH2 cerebral. Estas enzimas controlan tanto la generación como la eliminación del ACD en cerebro, el cual como se explicó anteriormente tendría una implicancia fundamental en numerosas conductas asociadas al ETOH, entre las cuales se encuentra el consumo del mismo (Aragón y Amit, 1985). Numerosos datos demuestran que, los niveles de actividad de estas enzimas se encuentran correlacionados con el consumo de

ETOH, lo cual sugiere que la actividad enzimática de las mismas sería un predictor del consumo de la droga.

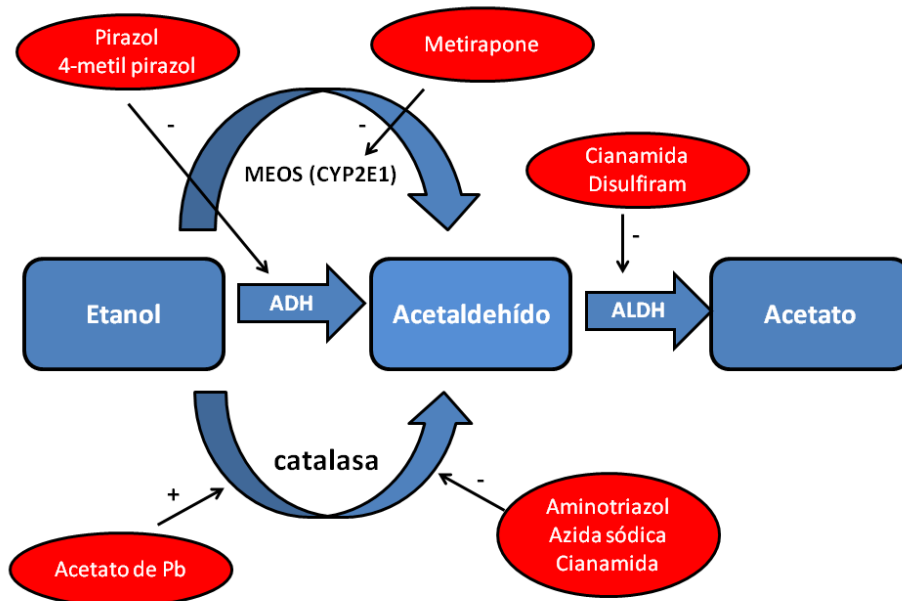


Figura 59: Moduladores de la actividad de CAT, ADH y ALDH, principales enzimas involucradas en el metabolismo del ETOH que modulan los niveles de ACD, extraído y modificado de Quertemont y cols, 2005).

Un ejemplo en humanos de esta variación determinada genéticamente ocurre en la población oriental, la cual posee un variante alélica de ALDH2 mitocondrial de baja  $K_m$ , lo cual produce una acumulación de ACD en sangre con manifestaciones de intoxicación que produce un síndrome conocido como *flushing*. Este síndrome genera una serie de síntomas muy aversivos y que son similares a los que produce la inhibición de la ALDH2, por parte de drogas como el disulfiram y que están aprobadas para el tratamiento farmacológico del alcoholismo (Mottin y cols, 1973). De esta forma el 50% de los individuos de raza japonesa y china, poseen una ALDH inactiva (ALDH2\*2) conocida como variante oriental en la cual se ha producido la sustitución de un aminoácido, concretamente de lisina por glutamato en posición 387. Esto se asocia con el síndrome de *flushing* y con una ingesta reducida de ETOH como consecuencia de síntomas aversivos. Así, este alelo parece conferir a esta población una mayor sensibilidad a la toxicidad del ETOH (Agarwal y Goede, 1987). Al respecto, es posible que el principal responsable de estos efectos, sea la acumulación de ACD a nivel periférico,

resultado de una disminución de afinidad de la enzima por el cofactor NAD<sup>+</sup> de modo que, a las concentraciones fisiológicas del cofactor, la enzima es virtualmente inactiva (Farrés y cols., 1994; Zhou y Weiner, 2000; Higuchi y cols, 1995). De esta forma, los niveles de ACD en sangre en individuos orientales con síndrome de *flushing* estos resultaron ser de 5 a 10 veces más elevados luego de la ingesta de dosis bajas de ETOH con respecto a quienes portan la forma alélica normal (Harada y cols, 1981, 1985; Goedde y cols, 1983b).

Resultados obtenidos en ratas que pertenecen a las cepas UchB y UchA, demuestran que estos animales muestran una capacidad diferencial de oxidación del ACD (Tampier y cols, 1984). Las ratas pertenecientes a las cepa UchA, presentan una mutación en la ALDH2, una ALDH2\*2 ineficiente, mientras que las UchB presentan una ALDH eficiente o normal. Esta diferencia presente en los polimorfismos genéticos de la ALDH en estos animales explicaría en parte la gran diferencia observada en el consumo de ETOH entre ambas cepas, presentando las UchA un consumo marcadamente menor que las UchB. Estas isoenzimas al igual que lo observado en la población humana, se diferencian en su afinidad (Km) con el cofactor NAD y en su velocidad máxima (Vmax) para la remoción del ACD (Tampier y Quintanilla, 2010). En otro estudio, se evaluaron ratas que presentan un mayor sensibilidad al ETOH (HAS, *high alcohol sensitive*) y aquellas que presentan una menor sensibilidad (LAS, *low alcohol sensitive*). Se encontró que también existe una diferencia en la actividad de ALDH entre ambas líneas en las células cerebelares de Purkinje, presentando una mayor actividad las ratas LAS (Zimatkin y Deitrich, 1995). En tanto, ratones KO para ALDH2 presentan niveles elevados de ACD en varios órganos y una disminución de la preferencia por el ETOH en relación a los WT (Isse y cols, 2002, 2005). En el caso de las líneas de ratas criadas en Finlandia (Eriksson y cols, 1968), las AA (Alko, Alcohol) presentan un elevado consumo de ETOH mientras que las ANA (Alko, no Alcohol) tienen un bajo consumo de ETOH. Consistentemente las ratas ANA presentan concentraciones más elevadas de ACD en sangre luego de la administración de ETOH que las ratas AA (Eriksson y cols, 1973); como consecuencia de una menor actividad de ALDH2, que estaría determinada genéticamente y sería la base para explicar el bajo consumo de ETOH en las AA (Koivisto y Eriksson, 1994). Otra línea de ratas, conocidas como LAP (*low alcohol preference*, baja preferencia de alcohol) muestra mayores niveles de ACD en sangre que sus contrapartes HAP (*high alcohol preference*), lo cual se atribuye nuevamente a una menor actividad de ALDH2. Por lo que además de las mutaciones enzimáticas, los niveles de



ACD en sangre parecen tener un impacto directo sobre el consumo voluntario de ETOH, lo cual se observa también en algunas poblaciones humanas como se mencionó con anterioridad (Eriksson y cols, 2001; Quintanilla y cols, 2005, 2007; Rivera-Meza y cols, 2010). Este incremento en sangre, produce un espectro de síntomas que, en su conjunto son aversivos (Eriksson y cols, 2001) y es lo que se ha definido como flushing que se manifiestan con náuseas, vómitos, taquicardia, mareos, sudoración profusa, enrojecimiento facial, visión borrosa, dolor de cabeza, hipotensión ortostática y dificultades respiratorias (Koppaka y cols, 2012)

### *Aproximaciones farmacológicas orientadas a la inhibición de ALDH2*

Varios enfoques farmacológicos se han propuesto basándose en las singularidades genéticas como las observadas en la población oriental, que intentan prevenir el consumo de ETOH a través de la acumulación periférica de ACD, como resultado de la inhibición de la ALDH. Precisamente esta acumulación periférica de ACD y los síntomas aversivos/negativos que produce en el individuo han sido utilizados para el tratamiento del alcoholismo. De hecho, los estudios con modelos animales diseñados a los efectos de inhibir la actividad de ALDH2 comenzaron hace más de 30 años, siendo la primera evidencia la que demostró que la administración de CIAN (cianamida 40 o 200 mg/kg en el alimento) tiene un efecto supresor sobre el consumo voluntario de ETOH (Sinclair y cols, 1980).

En la actualidad existen fármacos que inhiben la ALDH2 y que se encuentran disponibles en el mercado para tratar el alcoholismo, entre ellos el disulfiram (aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, FDA conocido como tetraetiltiuram disulfuro: Antabuse TM) y la cianamida (CIAN) (aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) como carbimide calcio: Temposil®). Ambos son inhibidores de la ALDH2 y producen síntomas aversivos, que desalientan al individuo a consumir ETOH y que se encuentran asociados a la acumulación periférica de ACD (Koppaka y cols, 2012). Su utilización ha producido un éxito desigual para detener el consumo y evitar la recaída en alcohólicos. En estudios con animales se ha demostrado que la disminución en el consumo de ETOH inducido por estos fármacos generalmente se produce cuando las ratas no tienen una larga historia de consumo de ETOH, no así cuando el consumo de estos animales se ha producido durante mucho tiempo (Tampier y cols, 2008; Garver y cols, 2000).

Sin embargo, la inhibición de la actividad de ALDH2 puede ser difícil de interpretar, ya que un fármaco sistémico que se dirige a la ALDH2 puede afectar tanto a nivel central como a nivel del metabolismo periférico del ACD. Si bien el efecto primario de la inhibición de la ALDH2, es inducir una masiva acumulación de ACD en el organismo con potenciales efectos tóxicos (Eriksson y cols, 1985; Hilbon y cols, 1983; Honda y cols, 1995), también produce un incremento de los niveles cerebrales de ACD. Este aumento se produce básicamente por dos mecanismos; inhibición de la ALDH2 cerebral, tanto por producir un aumento o acumulación local *in situ* del metabolito o como por ejercer una influencia en la barrera metabólica de ALDH2 que se encuentra en la vasculatura cerebral y por lo tanto, permitir que el ACD proveniente de la periferia penetre al SNC (Jamal y cols, 2003c). Por lo tanto, en la mayoría de los estudios en los que se intenta evaluar el impacto de la inhibición central de ALDH2, también debe administrarse un inhibidor de la ADH1. Mediante la inhibición de la ADH1 (que como se mencionó anteriormente no se encuentra presente en el cerebro) se evita la acumulación de ACD periférico, limitando de esta manera la contribución del ACD proveniente de la periferia (Correa y cols, 2012). Tambour (Tambour y cols, 2007a) demostró que la utilización de 4-MP (4 metil pirazol), un conocido inhibidor de ADH, fue capaz de prevenir los efectos de CIAN sobre la actividad locomotora (disminución), concluyendo que los efectos de la administración de CIAN tendrían su origen en el ACD producido en la periferia. Por el contrario, si el 4-MP falla se puede concluir que los efectos de CIAN se encuentran mediados centralmente a través de cambios en la actividad de CAT y/o ALDH cerebral (Tambour y cols, 2007a). Otra dificultad que surge en la interpretación de los resultados al utilizar, por ejemplo drogas inhibidoras de la ALDH2 como CIAN, reside en el hecho que se trata también de un inhibidor no competitivo de CAT (Aragón y cols, 1991c; DeMaster y cols, 1985, 1986), de tal manera que sus efectos sobre el cerebro son inciertos con respecto a las concentraciones de ACD. De hecho CIAN, bien podría aumentar los niveles de ACD a través de la inhibición de la ALDH o disminuir sus niveles por medio de un inhibición de CAT (Escarabajal y cols, 2003). En estudios *in vitro* con homogenatos de cerebro, incubados con ETOH y CIAN, se observó que el efecto neto de la CIAN fue reducir los niveles de ACD en las muestras de cerebro (Aragón y cols, 1999; Gill y cols, 1992). Sin embargo, la inhibición *in vivo* de la ALDH2 del hígado por CIAN, produce un drástico aumento en sangre del ACD, que puede difundir hacia el cerebro (Jamal y cols, 2003), contrarrestando así la reducción de la generación de ACD central debido a la inhibición local de CAT. Un estudio realizado

mediante la técnica de microdiálisis demostró que los niveles de ACD cerebral aumentaron luego de la administración de 1 g/kg de ETOH en ratas pretratadas con CIAN probablemente como consecuencia del aumento del ACD proveniente de la periferia que fue capaz de penetrar la barrera hematoencefálica (Jamal y cols, 2003).

Estudios realizados en animales han demostrado que la administración de 200 mg/kg de CIAN en el alimento, fue capaz de suprimir el consumo de libre elección de ETOH, tanto en un esquema de acceso intermitente como discontinuo (Sinclair y cols, 1980). Sin embargo, a una dosis de 25 mg/kg de CIAN administrada i.p. no se observaron efectos en el consumo, a diferencia de una supresión del mismo en animales que tuvieron un acceso continuo de ETOH, administrados diariamente con CIAN (25mg/kg) (Amit y cols, 1980). En cuanto a los paradigmas que emplean una sustancia palatable como sacarina, se observó que esta droga no suprimió su ingesta, pero sí se produjo una disminución de la preferencia de ETOH (Aragón y cols, 1993), lo cual indica los efectos específicos de CIAN sobre el consumo voluntario de ETOH. En otros experimentos se demostró que la administración s.c. de CIAN a 10 mg/kg 3 veces al día durante 4 días produjo una supresión del consumo de ETOH; por el contrario cuando los animales estuvieron deprivados de ETOH por un período se produjo un incremento significativo de la ingesta de la droga fue observado (Sinclair y Gible, 1985). Curiosamente, el único informe en el que CIAN se ha administrado tanto i.c.v. como i.p. en ratas que no habían consumido ETOH (Critchler y Myers, 1987), las dosis más bajas empleadas (0,03, 0,1 o 0,3 mg i.c.v. y 10 a 15 mg / kg i.p.) incrementaron la ingesta de ETOH, independientemente de la vía de administración, un resultado que los autores atribuyen al ACD generado endógenamente tanto en el cerebro como en la periferia. Sin embargo en este caso, no se determinaron los niveles de ACD.

Con respecto a los efectos de los inhibidores de la ALDH2 sobre la actividad locomotora inducida por ETOH los resultados obtenidos han sido contradictorios. La administración de dietilditiocarbamato, un metabolito activo del disulfiram, produjo una potenciación de la actividad locomotora inducida por ETOH (Escarabajal y Aragón, 2002b). Este efecto no fue suprimido con la administración de 4-MP, lo cual sugiere que en este caso estaría mediando por la acumulación del ACD central y no del periférico. En sentido opuesto, la administración de CIAN, redujo la actividad locomotora inducida por ETOH (Escarabajal y Aragón, 2002a; Sanchis-Segura y cols, 199b), efecto que fue abolido por la administración de 4-MP, lo cual sugiere una participación predominante de ACD periférico con respecto al ACD central (Escarabajal y Aragón, 2002a). Sin

embargo, se encontró una sinergia entre CIAN y AT, lo cual sugiere que la CAT fue la principal mediadora de los efectos de la CIAN sobre la actividad locomotora inducida por ETOH (Sanchis-Segura y cols, 1999b). A la inversa, cuando el ETOH se administró en ATV se registró que 10 mg/kg i.p. de CIAN produjeron un incremento en la locomoción inducida por ETOH (Martí-Prats y cols, 2013). Por lo tanto, los efectos de la inhibición de la ALDH2 sobre la actividad locomotora inducida por ETOH continúan siendo contradictorios y dependen en gran medida de la participación del ACD periférico o central.

*La manipulación de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo central del ETOH a través de su bloqueo o estimulación, ha sido una de las estrategias más ampliamente utilizadas para demostrar la implicancia del ACD en las conductas asociadas al ETOH. Estas enzimas controlan tanto la generación como la eliminación del ACD en cerebro, el cual estaría involucrado en numerosas conductas asociadas al ETOH. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la enzima responsable de su eliminación (ALDH) nos permitirá abordar la implicancia del ACD en varias respuestas al ETOH. Por lo tanto, esperaríamos que la administración de un inhibidor de la actividad de la enzima ALDH, a través de la acumulación de ACD efectúe modificaciones en el patrón de consumo observado en los animales. La administración sistémica del inhibidor, la cual conllevaría a una acumulación de ACD periférico podría llevar a una disminución del consumo de ETOH a través de los efectos aversivos desarrollados. Por el contrario la administración i.c.v. del inhibidor y la consecuente acumulación de ACD cerebral produciría el efecto opuesto incrementando el consumo de ETOH, a través de los efectos reforzantes del ACD.*

Sobre la base de estos antecedentes, el OBJETIVO de este capítulo fue diferenciar los efectos periféricos y centrales de la acumulación de ACD en respuesta a la inhibición de ALDH con CIAN, mediante el registro del consumo de ETOH y la actividad locomotora resultante de la ingesta voluntaria de la droga. Estas pruebas conductuales fueron complementadas con la determinación de los niveles de actividad de ALDH2 en hígado y cerebro.

## Materiales y Métodos:

### *Drogas y reactivos*

En esta sección se utilizaron las siguientes sustancias y drogas:

- **Soluciones de ETOH:** se prepararon de manera fresca todos los días de un stock de 96% de ETOH bidestilado (Porta Hnos., Córdoba, Argentina). Para lograr las concentraciones utilizadas en los experimentos conductuales (2 al 10%) fue disuelto en agua filtrada.
- **Cianamida (CIAN):** cianamida de calcio (Sigma-Aldrich, Argentina). La cual se preparó para las inyecciones sistémicas en 0,9% de solución SAL y se inyectó en una dosis de 25 mg /kg i.p., 30 min antes del consumo de ETOH. Para las microinfusiones en i.c.v. se preparó de manera aséptica a partir de una solución que contenía 0,1, 0,2 ó 0,3 mg y se disolvió en 2,5 µl de líquido cefalorraquídeo artificial CSF (NaCl 124,3mM; KCl 4,9 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,3 mM; H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> 1,25 mM; HNaCO<sub>3</sub> 25,6 mM; glucosa 10,4 mM; CaC<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,3 mM).
- **Ketamina:** clorhidrato de ketamina (Holliday Scott S.A, Argentina). Fue usado en la mezcla anestésica para las cirugías y administrado i.p. en una dosis de 55 mg/Kg.
- **Xilacina:** clorhidrato de xilacina (Richmond S.A, Argentina). Usado como complemento para la anestesia de cirugías y administrado en conjunto con ketamina en una dosis de 11 mg/Kg.
- **Norcilina:** consiste en una mezcla de penicilina y estreptomicina (Laboratorios Nort, S.A, Argentina) y fue usado como antibiótico luego de las cirugías.

### *Cianamida (CIAN)*

La CIAN, también denominada cianamida cálcica o carbamida cálcica o por sus nombres comerciales conocida como Temposil y Abstem, es una droga que se utiliza en el tratamiento de alcohólicos puesto que el efecto que produce es similar al del disulfiram, que va acompañado de un incremento del ACD en sangre, mediante la inhibición de la enzima ALDH2 (Marchner y Tottmar, 1976a). Los síntomas asociados a su

administración son náuseas, vómitos, taquicardia, mareos, sudoración profusa, enrojecimiento facial, visión borrosa, dolor de cabeza, hipotensión ortostática y dificultades respiratorias (Koppaka y cols, 2012). En este sentido, el efecto que produce es más rápido y tiene una menor duración comparado con el disulfiram (Deitrich y cols, 1976) e incluso sus efectos secundarios son menores al igual que las dosis empleadas, por lo que en algunos casos se aconseja su utilización con respecto al disulfiram. La desventaja que conlleva, es la posibilidad de reactivar el deseo “*craving*” por ETOH, lo cual posibilita que la persona bajo tratamiento pueda recaer en la adicción (Collins y Brown, 1960). Es una droga ampliamente utilizada en Europa, Canadá y Japón, aunque a pesar de esto los trabajos son escasos en la actualidad datan de los años 80s o, lo cual es sorprendente si se considera el hecho que es una droga autorizada para su uso actualmente.

Los estudios en humanos sugieren que en un primer momento la inhibición llevada a cabo por esta droga es rápida, aproximadamente 1 h (Obach y cols, 1986), siendo la vida media del compuesto de alrededor de 2 h (Pruñonosa y cols, 1986), pudiendo permanecer en el plasma al menos durante 8 h, mientras que la duración de su acción es de aproximadamente unas 24 h (Deitrich y cols, 1976; Brien y cols, 1978). Para ejercer su poder inhibitor, este compuesto parece requerir una previa bioactivación. Numerosos datos obtenidos, indicarían que la CIAN por sí misma no ejercería su efecto inhibitor, sino que lo haría a través de sus metabolitos. La N-hidroxicianamida sería uno de los productos intermediario de la oxidación de la CIAN, que al descomponerse de manera espontánea en cianida y nitroxil (Shirota y cols, 1987b) produce la inhibición de la actividad de ALDH2 a través de nitroxil. Al respecto, se ha demostrado que la inhibición causada por este metabolito, es capaz de producir dos formas distintas de inhibición de la enzima, una forma irreversible a un pH 7,0 y una forma reversible que es la forma predominante en los tejidos vivos y se genera a un pH 8,5 (De Master y cols, 1998). Sin embargo los resultados al respecto son contradictorios puesto que, algunos autores concluyen que no es necesaria la conversión de CIAN en un metabolito que ejerza un efecto inhibitorio sobre la ALDH2 (Pruñonosa y cols, 1989). A pesar de esto la mayoría de los estudios ponen de manifiesto que CIAN ejerce un efecto inhibitorio sobre la isoenzima de ALDH2, mitocondrial hepática de baja Km. Este efecto inhibitorio estaría mediado por el sistema enzimático de CAT, el cual posibilitaría la transformación de la CIAN en un compuesto activo que sería el que ejerce efectivamente la acción inhibitoria sobre la ALDH. Al respecto, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para determinar, cuál sería el compuesto responsable de la inhibición (DeMaster y cols,

1982; Shrota y cols, 1982a; Cederbaum y Dicker, 1985). Algunos autores han planteado la posibilidad de que la CAT sería la enzima responsable de transformar a CIAN en un metabolito potente y activo, capaz de inhibir a la ALDH2, (DeMaster y cols, 1984; Svanas y Weiner; 1985a; Cederbaum y Dicker, 1985). Mientras que otros plantean la posibilidad de la implicación de una N- acetiltransferasa dependiente del acetyl-S-CoA (Shrota y cols, 1984) o de la citocromo P-450 (DeMaster y cols, 1983; Shrota y cols, 1987).

Con respecto a CAT, se ha visto que la activación de CIAN es inhibida por el AT o la azida sódica, que son dos inhibidores de la actividad enzimática de esta enzima (DeMaster y cols, 1984). Se ha comprobado que si la incubación de la CIAN con CAT es previa a la adición de ETOH, se produce una inhibición del 70% de la enzima. Pero si ETOH y CIAN se añaden al mismo tiempo o durante un período corto de tiempo de incubación o después del ETOH, no se observa una inhibición de la actividad de CAT. De esta manera, la presencia de ETOH protegería contra la inactivación de CAT, producida por la CIAN. Además, los datos indican que la inhibición de la actividad de la CAT producida por CIAN es dosis dependiente.

En cuanto al grado de inhibición y sensibilidad con respecto a la inhibición de la CAT, por parte de CIAN en diferentes tejidos de rata es la siguiente: hígado > riñón > eritrocitos > corazón > cerebro; mientras que el grado de sensibilidad de estos tejidos a la inhibición provocada por CIAN, administrada i.p fue hígado > riñón > corazón > cerebro. Mientras que la actividad de los eritrocitos fue muy poco afectada (De Master y cols, 1986). También se ha observado que CIAN es capaz de inhibir tanto la ALDH hepática (alta Km) como la cerebral (Hellstrom y Tottmar, 1982), aunque existen diferencias entre la inhibición que ejerce en una y en otra. Si bien ninguna dosis es capaz de producir en ambos una inhibición completa, la ALDH2 hepática es mucho más susceptible que la cerebral, habiéndose descrito aproximadamente un 60% de inhibición para la ALDH hepática y un 40% de inhibición para la ALDH cerebral (Marchner y Tottmar, 1978). En cerebro, como se mencionó con anterioridad, se ha demostrado la presencia de ALDH tanto de baja Km como la de alta Km, mientras que en hígado se encuentra en mayor proporción de la de baja Km.

Se ha comprobado que CIAN es capaz de inhibir *in vivo* la ALDH de baja Km (Marchener y Tottmar, 1978; Cederbaum, 1981; Jarbe y cols, 1982) como la de alta Km (Deitrich y cols, 1976) en las tres fracciones, mitocondrial, microsomal y citosólica. Sin embargo, la de baja Km es más susceptible que la de alta Km, ya que se requieren dosis

más elevadas para lograr la inhibición de esta última (Marchner y Tottmar, 1978) si bien con ambas se requiere la presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADH}$  para que sean inhibidas por la CIAN (Marchner y Tottmar, 1983). Estos resultados demuestran que CIAN inhibe de manera preferencial, la ALDH de baja  $K_m$  que se encuentra en el hígado de rata (Loomis y Brien, 1983). Reforzando esta idea, se ha encontrado que después de un tratamiento con  $50 \mu\text{M}$  de CIAN la ALDH de baja  $K_m$  evidenciaba un 20% de actividad mientras que la ALDH2 presenta más del 80% (Svanas y Weiner, 1985). Lo mismo se observó cuando se trataron ratas sistémicamente con  $100 \text{ mg/kg}$  de CIAN (Marchner y Tottmar, 1978).

En cuanto a los niveles de ACD, se ha comprobado que CIAN induce un incremento considerable del mismo en sangre (Deitrich y cols, 1976; Brien y cols, 1978) aproximadamente 120 veces más que el grupo no tratado. Sin embargo, como se explicó con anterioridad, uno de los problemas que conlleva esta inhibición es el incremento del ACD central, que produce un efecto contrario al producido en la periferia.

#### *Consumo voluntario de ETOH:*

Empleando el mismo protocolo descrito en los capítulos anteriores se eligió como paradigma conductual el consumo voluntario de ETOH de libre elección ETOH/ $\text{H}_2\text{O}$  durante 2 h diarias. Para ello crías de 35 días de edad se alojaron de a pares y se restringió el acceso de líquido durante 24 horas previas al comienzo del esquema de consumo voluntario. Éste estuvo limitado a 2 h diarias (13:00-15:00 h), y los animales tuvieron acceso durante este tiempo a 4 probetas, 2 que contenían  $\text{H}_2\text{O}$  y 2 con concentraciones crecientes de ETOH, de acuerdo al siguiente esquema (v/v): días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; 13-16 días: 8%; y 10% a partir del día 17 hasta el final de los experimentos. Los últimos 4 días del paradigma (los cuales difirieron de acuerdo a la ruta de administración seleccionada para la droga), los animales fueron inyectados vía i.p. con: a) solución salina -grupo SAL-, b) CIAN ( $25 \text{ mg/kg}$ , 30 min antes del esquema de consumo de ETOH) -grupo CIAN i.p.-, y otro grupo de animales fueron implantados con una cánula en el ventrículo lateral y microinfundidos i.c.v. con: c) vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial CSF) -grupo VEH-, y d) CIAN (en una dosis de 0,1; 0,2 ó 0,3 mg disueltos en  $2,5 \mu\text{l}$  de vehículo inmediatamente antes del consumo de ETOH) -grupo CIAN i.c.v.-.



En el caso de los animales microinfundidos, el día 21 del esquema de ingesta de ETOH luego del acceso durante 4 días a una solución de ETOH al 10%, fueron anestesiadas y sometidas a las cirugías correspondientes, tal como se explica a continuación. Ese día los animales de manera excepcional vieron interrumpido su esquema normal de consumo luego de la cirugía, con el objetivo de facilitar su recuperación por lo que tuvieron un acceso ilimitado únicamente a H<sub>2</sub>O, durante 24 h. Posteriormente, se retiró el H<sub>2</sub>O para volver a someter a los animales al esquema de consumo voluntario de ETOH durante 2 h diarias. Luego de 4 días de consumo a una concentración del 10%, los animales fueron microinfundidos con VEH o CIAN, durante 4 días adicionales tal como se explica a continuación y se indica en el esquema de la figura 65.

Para realizar las cirugías los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina en dosis de 55 mg/Kg y 11 mg/Kg, respectivamente administrada vía i.p. Una vez que se constató que estuvieran correctamente anestesiados, los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico Stoelting (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) y la barra dental incisiva ubicada a -3,3 mm por debajo de la línea interaural. El cráneo fue expuesto cortando la piel del animal y liberando las meninges y los orificios realizados con un torno de uso odontológico para poder implantar las cánulas guías y tornillos que fueron fijados con cemento de uso dental. Las cánulas guías de acero inoxidable (de 10 mm de largo fabricadas a partir de agujas de 22G) fueron implantadas unilateralmente del lado derecho a 2 mm por encima del sitio seleccionado para la microinfusión. Las coordenadas utilizadas: AP -0.92, ML-1.5 y DV -3.6 fueron elegidas de acuerdo al atlas Paxinos y Watson (2009), considerando como referencia al bregma. Para disminuir el riesgo de infecciones, una vez finalizadas las cirugías los animales recibieron inyecciones s.c. durante 2 ó 3 días de una suspensión antibiótica formada por penicilina/estreptomina (Norcilina). Se les permitió recuperarse durante 2 días durante los cuales los animales tuvieron libre acceso a H<sub>2</sub>O y alimento, y a continuación se reanudó el esquema de consumo voluntario de ETOH al 10%. Para la infusión i.c.v. se introdujo un inyector 30G dentro de las cánulas guías, el cual excedió 2,5 mm desde el sitio final de la cánula hasta alcanzar el sitio de inyección en el ventrículo lateral. Los inyectores se conectaron a una microjeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) de 10  $\mu$ l vía un catéter de polietileno (P10, Becton Dickinson, MD) y se liberó un volumen de 2,5  $\mu$ l (ver dosis en Drogas y reactivos) en un período de 2,5 min (1  $\mu$ l/min), utilizando una bomba de infusión (MasterFlex pump, Modelo 77200-20). Finalizada la

infusión, los inyectores se mantuvieron en el sitio de inyección durante 1 min adicional para permitir la liberación completa de la solución. Al igual que en los experimentos mencionados anteriormente, la ingesta diaria de ETOH se registró y fue expresada como g de ETOH consumido/kg de peso corporal, y como el porcentaje de preferencia de ETOH consumido respecto al H<sub>2</sub>O. Dos grupos adicionales se incluyeron como controles: DPN35, y DPN63 noETOH, es decir animales jóvenes y adultos que no estuvieron sometidos al esquema de consumo voluntario. En la figura 60 puede observarse el esquema utilizado.

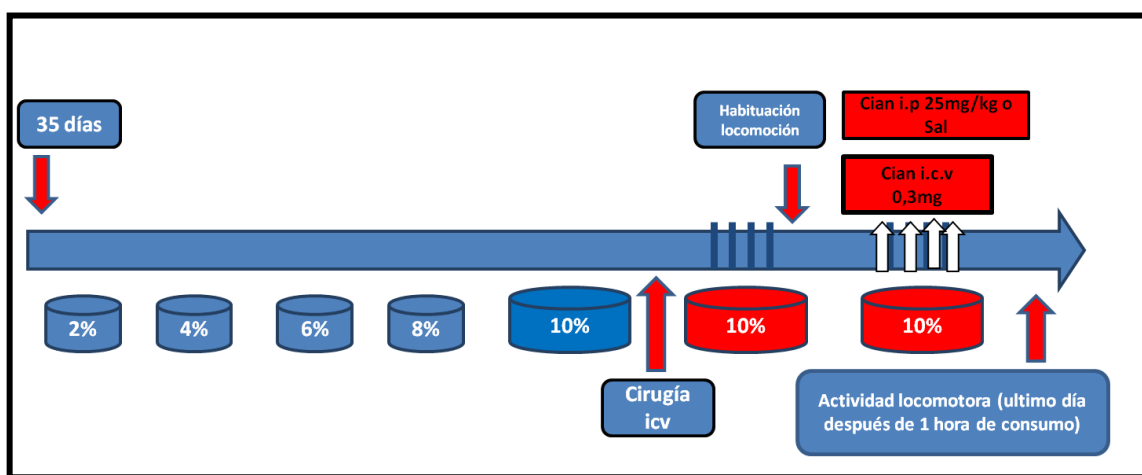


Figura 60: Esquema de las distintas vías de administración de CIAN en el consumo voluntario de ETOH. Durante los últimos 4 días de consumo al 10% se administró CIAN i.p 25mg/kg o SAL o bien CIAN 0,3 mg i.c.v.

Al finalizar el registro de la actividad locomotora todos los animales fueron sacrificados según la edad y grupo correspondiente para obtener sangre, tejido cerebral (áreas cerebrales: corteza prefrontal, estriado, núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo y cerebelo y cerebro entero) e hígado. En consecuencia, tanto para animales C como para los expuestos perinatalmente al Pb quedaron conformados los 8 grupos experimentales, que se detallan a continuación:

- *Grupo DPN35 (C y Pb)*: en el cual las crías fueron sacrificadas a los 35 días de edad (DPN35). Este grupo revela los niveles basales de los parámetros analizados en ambos grupos de animales periadolescentes (previo al inicio del esquema de consumo de ETOH).
- *Grupo DPN63 ETOH SAL (C y Pb)*: animales sacrificados al final del consumo de ETOH luego de ser inyectados con SAL durante los últimos 4 días del esquema

de consumo voluntario de ETOH. Este grupo refleja las modificaciones producidas en animales adultos en los parámetros analizados resultantes del consumo crónico de ETOH.

- *Grupo DPN63 ETOH CIAN i.p. (C y Pb):* animales sacrificados al final del consumo de ETOH luego de ser inyectados i.p. diariamente durante 4 días con CIAN. Este grupo refleja el efecto de la inhibición de la enzima ALDH (a nivel del metabolismo periférico) sobre el consumo voluntario de ETOH, y como esto repercute sobre la actividad locomotora.
- *Grupo DPN63 no ETOH CIAN i.p. (C y Pb):* animales adultos sacrificados durante el DPN63, que no estuvieron sometidos al esquema de consumo de ETOH luego de ser inyectados i.p. diariamente durante 4 días con CIAN (DPN63 noETOH-CIAN i.p.). Este grupo representa un control del efecto de la inhibición de la enzima ALDH (a nivel del metabolismo periférico).
- *Grupo DPN63 ETOH VEH (C y Pb):* animales sacrificados al final del consumo de etanol (DPN63) luego de ser microinfundidos i.c.v. diariamente con VEH (CSF) durante los últimos 4 días del esquema de consumo voluntario de ETOH (DPN63 ETOH-VEH). Este grupo es un control de los animales adultos que estuvieron sometidos al esquema de consumo voluntario y microinfundidos con CIAN.
- *Grupo DPN63 ETOH CIAN i.c.v. (C y Pb):* animales sacrificados al final del consumo de ETOH luego de ser microinfundidos i.c.v. diariamente durante 4 días con CIAN (DPN63 ETOH-CIAN i.c.v.). Este grupo refleja el efecto de la inhibición de la enzima ALDH (a nivel del metabolismo central) en animales que consumieron voluntariamente ETOH.
- *Grupo DPN63 noETOH CIAN i.c.v. (C y Pb):* animales sacrificados durante el DPN63, que no estuvieron sometidos al esquema de consumo de ETOH luego de ser microinfundidos i.c.v. diariamente durante 4 días con CIAN (DPN63

noETOH-CIAN i.c.v). Este grupo representa el control de los animales adultos del efecto de la inhibición de la enzima ALDH (a nivel del metabolismo central).

- *Grupo DPN63 noETOH (C y Pb)*: animales que no fueron sometidas al paradigma de consumo de ETOH y a los que se sacrificó a la misma edad que aquellos que consumieron ETOH voluntariamente. Este grupo se usó como control de la misma edad de animales adultos (para animales SAL y VEH).

#### *Actividad locomotora:*

La actividad locomotora fue determinada, mediante la utilización de actógrafos tal como describió previamente. Durante la última sesión de ingesta voluntaria, en el DPN63 (de 1 h de duración), todos los grupos de animales adultos fueron colocados individualmente en los actógrafos durante 60 min en intervalos de 10 min en una habitación aislada de sonidos externos. Al finalizar la prueba, fueron sacrificados para obtener muestras de sangre, hígado y tejido cerebral para las determinaciones de la actividad de CAT y ALDH2, tal como se describe a continuación. Es importante mencionar que manteniendo el mismo protocolo ya utilizado, todos los animales fueron habituados previamente tanto a la habitación como a las cajas del aparato locomotor un día antes del test durante 60 min (datos no mostrados).

#### *Actividad enzimática de ALDH2:*

La actividad de la enzima ALDH2 se determinó de acuerdo a Gill y cols, 1996 y Escrig y cols, 2012 (Gill y col 1996, Escrig y col 2012) con algunas modificaciones. Se determinó la actividad tanto en hígado como en cerebro (tejido total y áreas cerebrales). Las determinaciones se llevaron a cabo en homogeneizados mitocondriales obtenidos por centrifugación diferencial. Brevemente, el tejido se homogeneizó en sacarosa 0,25 M y EDTA 0,1 mM en una proporción del 10% p/v y se centrifugó a 800 g 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante (1 ml aprox.) se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, y el sedimento se resuspendió en sacarosa 0,25 M adicionando el 1% v/v Tritón X100. Después de un período de 30 min a -80 °C, el tejido ya descongelado se centrifugó nuevamente a 10.000 g durante 10 min. A 300 ul del sobrenadante resultante se le añadió 500 ul de un reactivo que contiene 50 mM de pirofosfato de sodio (pH=8,8), 0,2 mM de 4metil pirazol; 2,0 M rotenona; 1,0 mM NAD<sup>+</sup>; 1,0 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,25 M de sacarosa para completar 5 ml y se

incubaron a 25 °C durante 20 min. Inmediatamente después, 0,1 ml de acetaldehído se añadió como un sustrato para iniciar la reacción. La solución se mezcló manualmente durante 30 seg y se leyó la absorbancia a 340 nm durante 10 min. Los resultados se expresaron como mg de proteína/min/NADH nmol ( $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 6,31 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ ).

Para la administración sistémica de CIAN, se evaluó la actividad enzimática de ALDH2 en hígado y en tejido cerebral (entero o en las aéreas que se mencionaron anteriormente) y para la administración i.c.v. de CIAN, se midió la actividad de ALDH2 sólo en cerebro entero y en las aéreas cerebrales mencionadas. Es importante mencionar que debido a la afinidad por el sustrato y la inhibición preferencial que se ha demostrado la CIAN ejerce sobre la ALDH2 (Crabb y cols, 2004), todas las determinaciones se realizaron en homogeneizados provenientes de mitocondrias.

#### *Actividad enzimática de CAT:*

La actividad de CAT se determinó siguiendo el mismo procedimiento que en el capítulo II por el método de Aebi (Aebi, 1984) y se determinó en todos los grupos (excepto en los grupos DPN63 noETOH CIAN (0,2 y 0,1 mg). Se midió en hígado, sangre y tejido cerebral.

La actividad de la CAT en hígado se midió siguiendo el mismo procedimiento descrito para las distintas áreas cerebrales, excepto que el tejido se diluyó 1/20 con tampón de fosfato. La actividad resultante también se expresó como unidades de actividad/min/ml/mg de proteína.

#### **Análisis estadístico:**

Como se explicó anteriormente y con el objetivo facilitar el análisis estadístico, los datos diarios de la ingesta diaria y la preferencia de ETOH se dispusieron en bloques de 4 días, perteneciendo cada uno de ellos a la misma concentración de la droga. Fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, contrastando la variable grupo frente a la concentración de ETOH/tiempo como la variable repetida. Para analizar el efecto del tratamiento con CIAN, los datos también fueron analizados por un ANOVA de dos vías comparando las variables grupos (C *vs* Pb) y tratamiento (SAL *vs* CIAN i.p o VEH *vs* CIAN i.c.v.).

La actividad locomotora fue analizada de manera separada en función del consumo de ETOH (ETOH *vs* noETOH) mediante un ANOVA de tres vías de medidas repetidas: grupo (C *vs* Pb), tratamiento (SAL *vs.* CIAN i.p. o VEH *vs.* CIAN i.c.v.) y tiempo como la variable repetida. Las cuentas totales fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías: grupo (C *vs* Pb) y tratamiento (SAL *vs.* CIAN i.p, VEH *vs.* CIAN i.c.v.).

La actividad de CAT y ALDH2 en sangre, hígado y en cerebro se analizaron por medio de un ANOVA de dos vías: grupo (C *vs* Pb) y tratamiento (SAL *vs.* CIAN i.p. o VEH *vs.* CIAN i.c.v.), según los animales hayan estado sometidos o no al esquema de consumo voluntario. Se realizó un análisis de un ANOVA de dos vías separado para cada región cerebral.

En todos los casos, cuando se encontró una interacción significativa, se realizó la prueba Tuckey como *post hoc*, con el resultado de los valores de *p* indicados en las leyendas de las figuras.

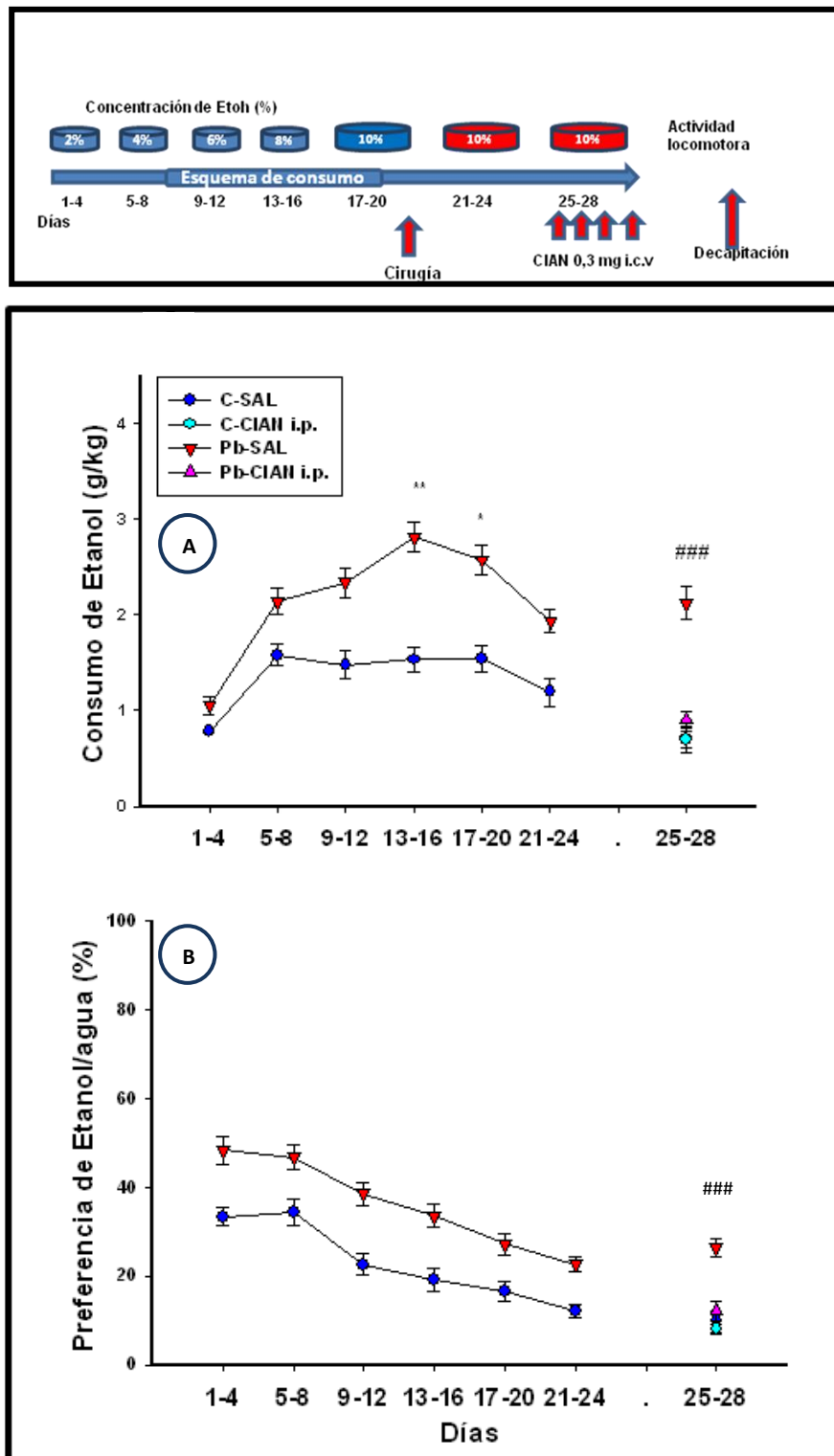
## Resultados:

### *Consumo voluntario de Etanol:*

#### Administración sistémica de CIAN

Como puede observarse en la figura 61A) se encuentra representado el consumo voluntario de ETOH, y en la figura 61B) la preferencia a ETOH en condiciones basales (días 1-24), y posterior a la administración sistémica de CIAN (25 mg/kg i.p.; días 25-28). Como se reportó anteriormente, la exposición perinatal a Pb aumentó la ingesta voluntaria de ETOH, tendencia que ya se observó al 2%, llegando a una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones del 8% y 10% de ETOH (grupo x tiempo:  $F(1,48)=48,9$ ;  $p<0,001$ ). La administración sistémica de CIAN redujo el consumo de ETOH de forma selectiva en el grupo expuesto al Pb, evidenciándose una diferencia significativa en las variables grupo:  $F(1,46)=38,6$ ;  $p<0,001$ , tratamiento:  $F(1,46)=22,3$ ;  $p<0,001$  y en la interacción grupo x tratamiento  $F(1,46)=21,9$ ;  $p<0,001$ . Se obtuvieron resultados similares para la preferencia de ETOH, grupo y tiempo:  $F(1,48)=32,9$ ;  $p<0,001$ . Sin embargo, después de la administración de CIAN se encontró una significación estadística en todos los parámetros (variables grupo:  $F(1,46)=28,2$ ;  $p<0,01$ , tratamiento:  $F(1,46)=10$ ;  $p<0,01$  y en la interacción grupo x tratamiento

$F(1,46)=16,6$ ;  $p<0,01$ ) siendo el grupo de Pb-SAL diferente a los otros tres grupos ( $p<0,001$ ) y observándose una marcada disminución del consumo en el grupo Pb-CIAN i.p., que alcanzó valores similares a los animales C, grupo en el que no se observó ningún efecto producto de la administración de CIAN.



**Figura 61: Consumo voluntario de etanol en respuesta a la administración sistémica de CIAN (25mg/Kg i.p)** A) Expresado como g de ETOH por Kg de peso corporal y B) porcentaje de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media  $\pm$  ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, estos datos corresponden a las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días: 13-16 8%, y días 17-24: 10%. \* indica diferencias en comparación con los C en \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . Administración de CIAN: #denota diferencias entre los Pb-SAL y Pb-CIAN con ###  $p < 0,0001$ . C-SAL=13; C-CIAN=10; Pb-SAL=15; Pb-CIAN=13 animales por grupo.

### *Actividad locomotora:*

Se evaluó la actividad locomotora inmediatamente después del esquema de consumo voluntario de ETOH (última sesión de 1 h) en respuesta a la administración de SAL o CIAN sistémica, datos que se encuentran representados en la figura 62A) mientras que los correspondientes grupos noETOH se presenta en la figura 62B). Reproduciendo los resultados anteriores se observó un aumento de la actividad locomotora selectivamente en los animales expuestos al Pb, como consecuencia de la cantidad de ETOH ingerido en la sesión previa de consumo voluntario de ETOH a la cual estuvieron sometidos estos animales. Interesantemente, y en paralelo a los efectos observados en el consumo voluntario tras la administración de CIAN, la administración de la droga previa al consumo que fue capaz de disminuir el consumo elevado en los animales expuestos al Pb, también revertió el incremento en la actividad locomotora observada diferencialmente en este grupo, sin ningún efecto en los animales C. En los resultados del ANOVA para las cuentas cada 10 min se evidenció una diferencia estadística en la interacción grupo x tratamiento x tiempo:  $F(1,5)=2,53$ ;  $p < 0,05$ , y en la interacción grupo x tratamiento:  $F(1,66)=20,6$ ;  $p < 0,001$ ). El ANOVA de las cuentas cada 10 min reveló una diferencia significativa para la interacción en los tres factores con un  $p < 0,05$  en los animales que no han consumido ETOH.



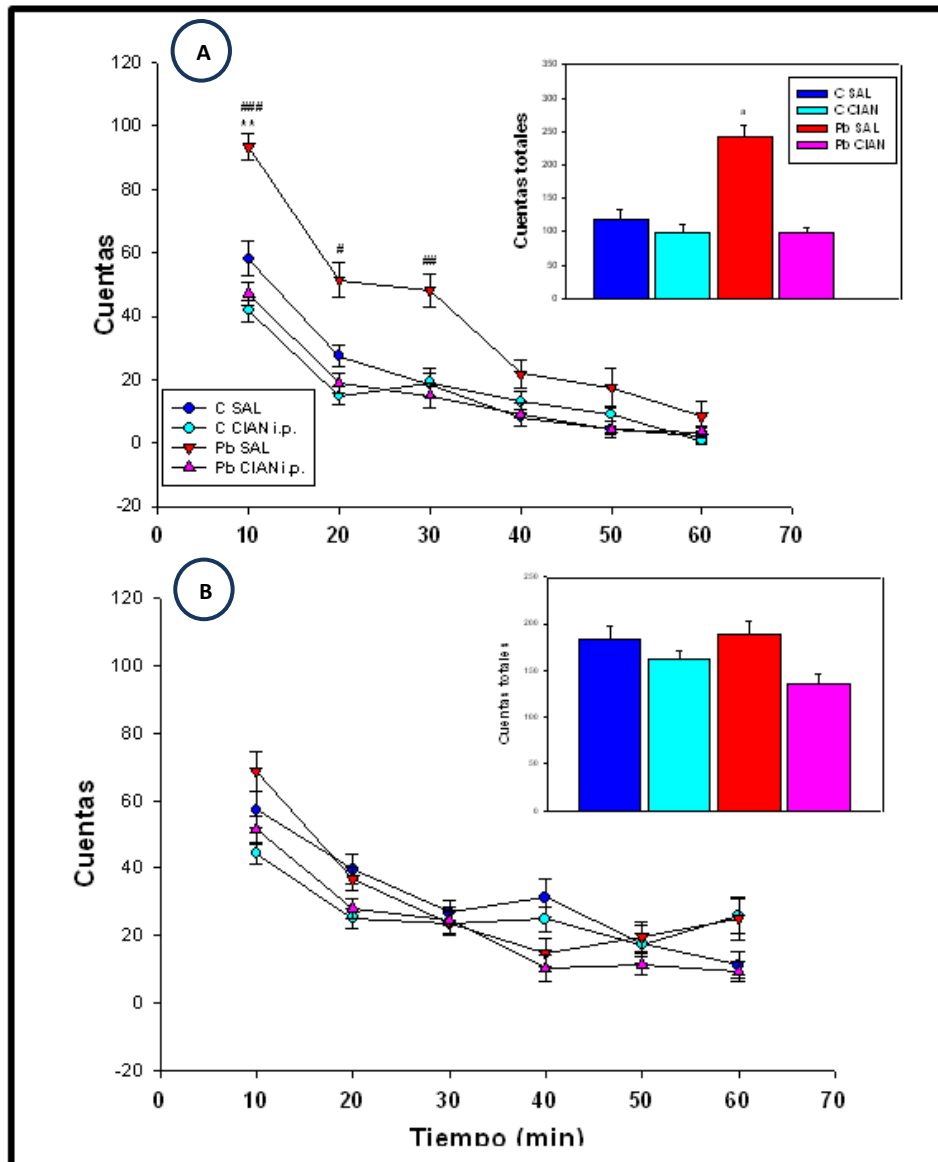


Figura 62: Efecto del consumo voluntario de ETOH en la actividad locomotora. La actividad locomotora se evaluó inmediatamente después del consumo de ETOH A) así como en los animales que no consumieron ETOH B). \* Indica diferencias entre el grupo C y el grupo Pb inyectado con SAL en  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . #indica diferencias entre el grupo Pb-SAL y el grupo Pb-CIAN en # $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ , y ###  $p < 0,001$ . La letra "a" indica una diferencia significativa a  $p < 0,001$  en comparación con todos los demás grupos. Número total de animales que estuvieron sometidos al consumo voluntario de ETOH: C-SAL=17; C-CIAN=16; Pb-SAL=18; Pb-CIAN=19; en el grupo noETOH: C-SAL=11; C-CIAN=13; Pb-SAL=13; Pb-CIAN=18.

*Consumo voluntario de Etanol:**Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,3 mg)*

En la figura 63 se representan la ingesta voluntaria de ETOH y la preferencia en los animales expuestos al Pb y en sus C respectivos. En la parte superior se encuentra graficado el esquema de consumo voluntario así como el protocolo de microinfusión de CIAN i.c.v. Se representa en este gráfico<sup>®©</sup> VUBGIKUUIJUNVIV C K,J Mk la dosis de 0,3 mg CIAN que fue la que produjo una mayor diferencia estadística significativa de las tres dosis utilizadas. Reproduciendo resultados anteriores, las ratas expuestas a Pb presentan un mayor consumo voluntario en relación a sus respectivos C (grupo x tiempo:  $F(5,200)=2,92$ ;  $p<0,05$ ), el cual es significativo en la concentración de ETOH al 8%. La administración de CIAN resultó en una diferencia estadística para los parámetros grupo  $F(1,38)=37,5$ ;  $p<0,001$  y tratamiento:  $F(1,38)=56,715$ ;  $p<0,001$ , aunque no se encontró una interacción significativa entre ellos, probablemente debido a que ambos grupos aumentaron en forma conjunta la ingesta de ETOH. Esta diferencia fue significativa en el grupo C (C-VEH *vs* C-CIAN), observándose una marcada tendencia en los animales expuestos al Pb (Pb-VEH *vs* Pb-CIAN). Por otra parte, se observó una interacción significativa cuando la preferencia de ETOH fue evaluada en ambos grupos, en condiciones basales (grupo x tiempo:  $F(5,200)=2,85$ ;  $p<0,05$ ) y después de la administración de CIAN (grupo x drogas:  $F(1,38)=29,05$ ;  $p<0,001$ ).

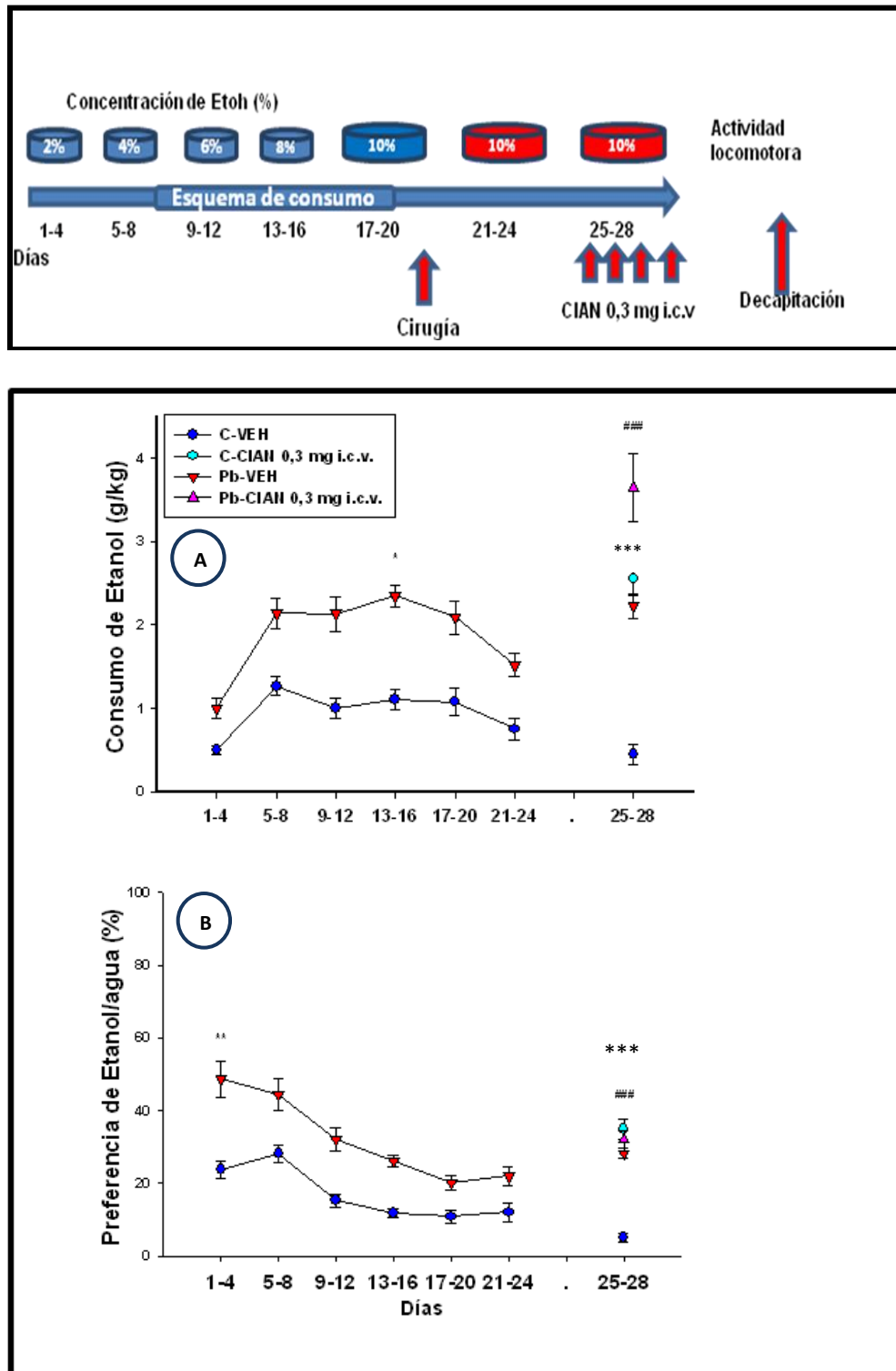


Figura 63: Consumo voluntario de etanol en respuesta a la administración i.c.v. de CIAN (0,3 mg i.c.v.) A) Expresado como g de ETOH por Kg de peso corporal y B) porcentaje de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media  $\pm$  ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, estos datos corresponden a las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días: 13-16 8%, y días 17-24: 10%. \* indica diferencias en comparación con los C en \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . Administración de CIAN: #denota diferencias entre los grupos SAL y los

correspondientes CIAN para C y animales expuestos a Pb con ###  $p < 0,01$ . C-VEH = 11; C-CIAN i.c.v. = 14; Pb-VEH = 8; Pb-CIAN i.c.v.= 8 animales por grupo.

### *Actividad locomotora:*

Como puede observarse en la figura 64A) la administración de CIAN i.c.v. previa al esquema de consumo voluntario de ETOH, provocó un incremento significativo en la actividad locomotora en los animales C en concordancia con el incremento del consumo voluntario en este grupo. Con respecto a los animales expuestos a Pb si bien se observa una tendencia en el consumo voluntario de ETOH, la actividad locomotora no se incrementó de manera significativa. Como puede observarse en el gráfico, el incremento de la actividad locomotora se produjo durante los primeros 10 min. En la evaluación de las cuentas cada 10 min o en la suma total de cuentas se observó una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos en la interacción grupo x tratamiento x tiempo:  $F(5,210)=2,90$ ;  $p < 0,05$ . Como era de esperarse, no hubo diferencias significativas en los animales que no estuvieron sometidos al esquema de consumo voluntario de ETOH como puede observarse en la figura 63B).

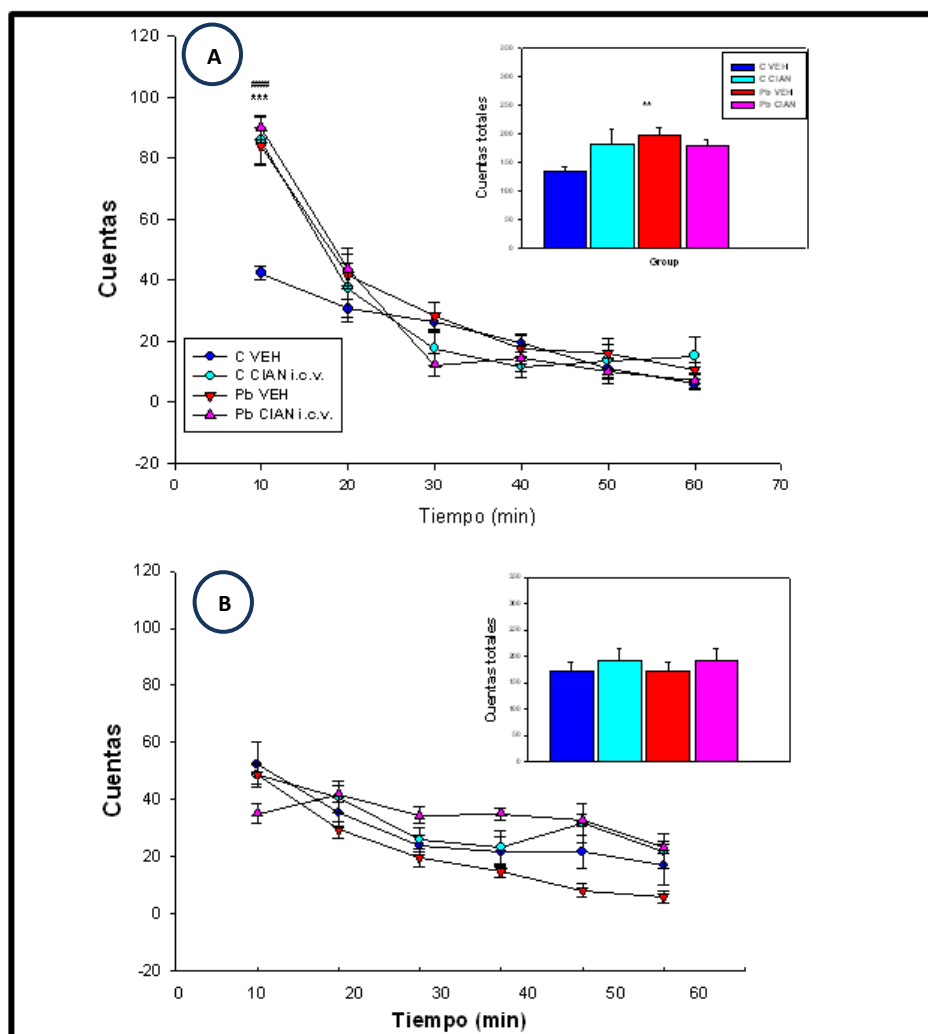


Figura 64: Efecto del consumo voluntario de ETOH en la actividad locomotora. La actividad locomotora se evaluó inmediatamente después del consumo de ETOH A) y en sus contrapartes noETOH B). \* Indica diferencias entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH en  $***p < 0,001$ . #indica diferencias entre el grupo Pb-VEH y el grupo Pb-CIAN a  $###p < 0,001$ . \*indica una diferencia entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH a  $**p < 0,001$ . Animales totales en el grupo que estuvo sometido al consumo voluntario de ETOH: C-VEH=22; C-CIAN=16; Pb-VEH=20; Pb-CIAN=19; y en el grupo noETOH: C-VEH=9; C-CIAN=9; Pb-VEH=19; Pb-CIAN=7.

### Consumo voluntario de Etanol:

#### Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,2 mg).

En la figura 65 se representan la ingesta voluntaria de ETOH y la preferencia en los animales expuestos al Pb y en los C. En la parte superior se encuentra representado el esquema de consumo voluntario y el protocolo de microinfusión de CIAN en i.c.v. Asimismo se representa en este gráfico la dosis de CIAN de 0,2 mg que fue la dosis intermedia de las tres utilizadas. Reproduciendo los resultados obtenidos anteriormente,

las ratas expuestas a Pb presentan un mayor consumo voluntario de ETOH en relación a sus respectivos C. Así, los datos obtenidos en el ANOVA para muestras repetidas indican un efecto significativa del factor tratamiento perinatal, grupo (C *vs* Pb):  $F(1,210)=52,83$ ;  $p<0,001$  así como de la variable repetida (tiempo/concentración de ETOH):  $F(5,210)=4,93$ ;  $p<0,001$ , y de la interacción entre ambos:  $F(5,210)=5,848$ ;  $p<0,05$ , el cual fue significativo en la concentración de ETOH al 6%. La administración de CIAN resultó en una diferencia estadísticamente significativa para los parámetros grupo:  $F(1,40)=22,85$ ;  $p<0,001$  y tratamiento:  $F(1,40)=75,49$ ;  $p<0,001$ , observándose una interacción significativa entre ellos:  $F(1,40)=13,40$ ;  $p<0,001$ , siendo significativa en el grupo C (C-VEH *vs* C-CIAN). Por otra parte, la preferencia de ETOH en condiciones basales el análisis del ANOVA reveló una diferencia significativa para los parámetros grupo:  $F(1,210)=72,91$ ;  $p<0,001$  y tiempo  $F(5,210)=30,49$ ;  $p<0,001$  pero no para la interacción entre ambos. Posterior a la administración de CIAN se evidenció un efecto de grupo:  $F(1,40)=13,48$ ;  $p<0,001$  y tratamiento:  $F(1,40)=32,90$ ;  $p<0,001$  así como en la interacción entre ambos:  $F(1,40)=7,95$ ;  $p<0,05$ ), siendo significativa en el grupo C (C-VEH *vs* C-CIAN).

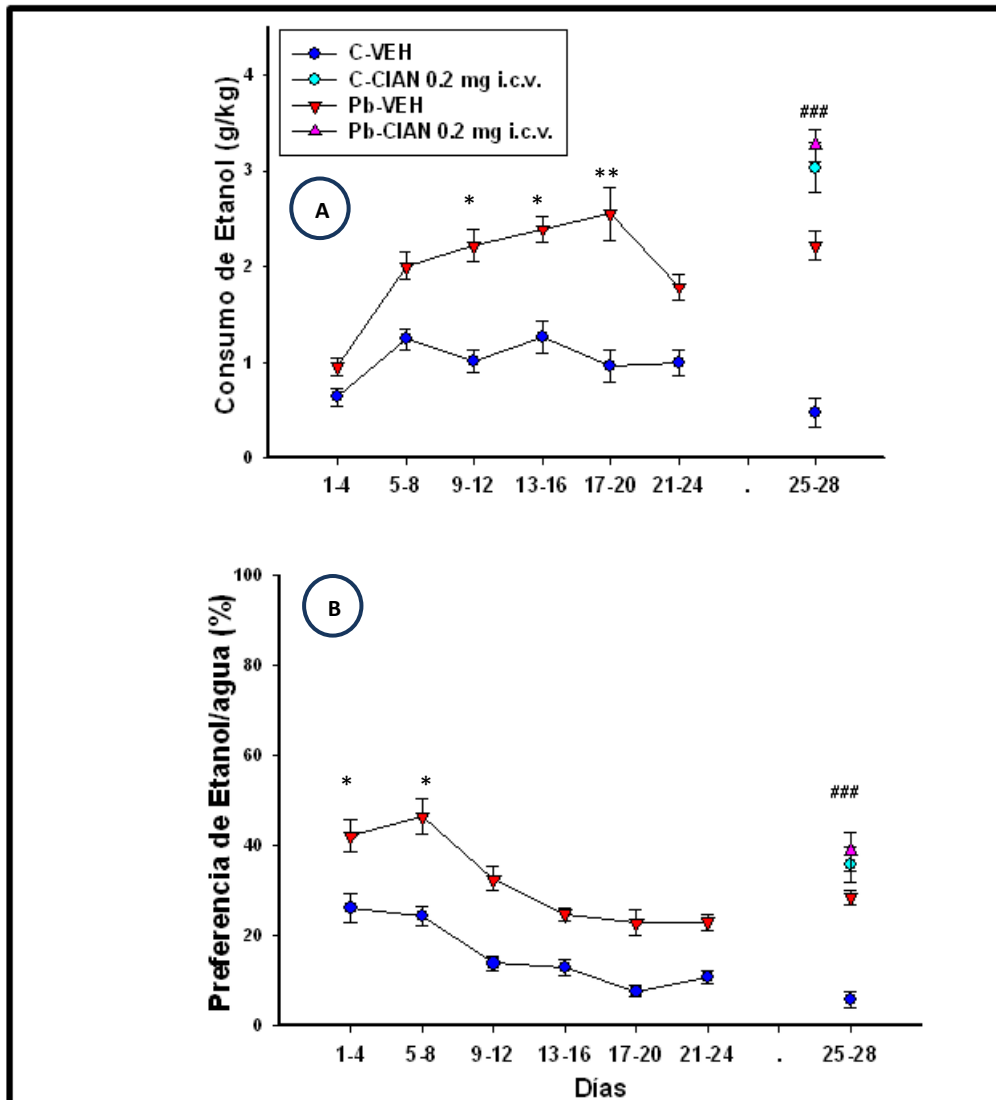


Figura 65: Consumo voluntario de etanol en respuesta a la administración i.c.v. de CIAN (0,2 mg i.c.v.) A) expresado como g de ETOH por Kg de peso corporal y B) porcentaje de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media  $\pm$  ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, estos datos corresponden a las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días: 13-16 8%, y días 17-24: 10%. \* indica diferencias en comparación con los C en \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . Administración de CIAN: #denota diferencias entre los animales tratados con SAL y los correspondientes grupos CIAN para animales C y expuestos a Pb con ###  $p < 0,001$ . C-VEH=11; C-CIAN i.c.v.= 8; Pb-VEH=8; Pb-CIAN i.c.v.=6 animales por grupo.

#### Actividad locomotora:

Como puede observarse en la figura 66 la administración de CIAN i.c.v. previo al esquema de consumo voluntario de ETOH, provocó nuevamente un incremento significativo en la actividad locomotora en los animales C en concordancia con el

aumento del consumo voluntario en este grupo. Con respecto a los animales expuestos al Pb si bien se observa una tendencia en el consumo voluntario de ETOH, la actividad locomotora no sufrió modificaciones de manera significativa. En la evaluación de las cuentas acumuladas cada 10 min o en la suma total de cuentas se observó una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos en la interacción grupo x tratamiento x tiempo:  $F(5,325)=3,125$ ;  $p<0,05$ .

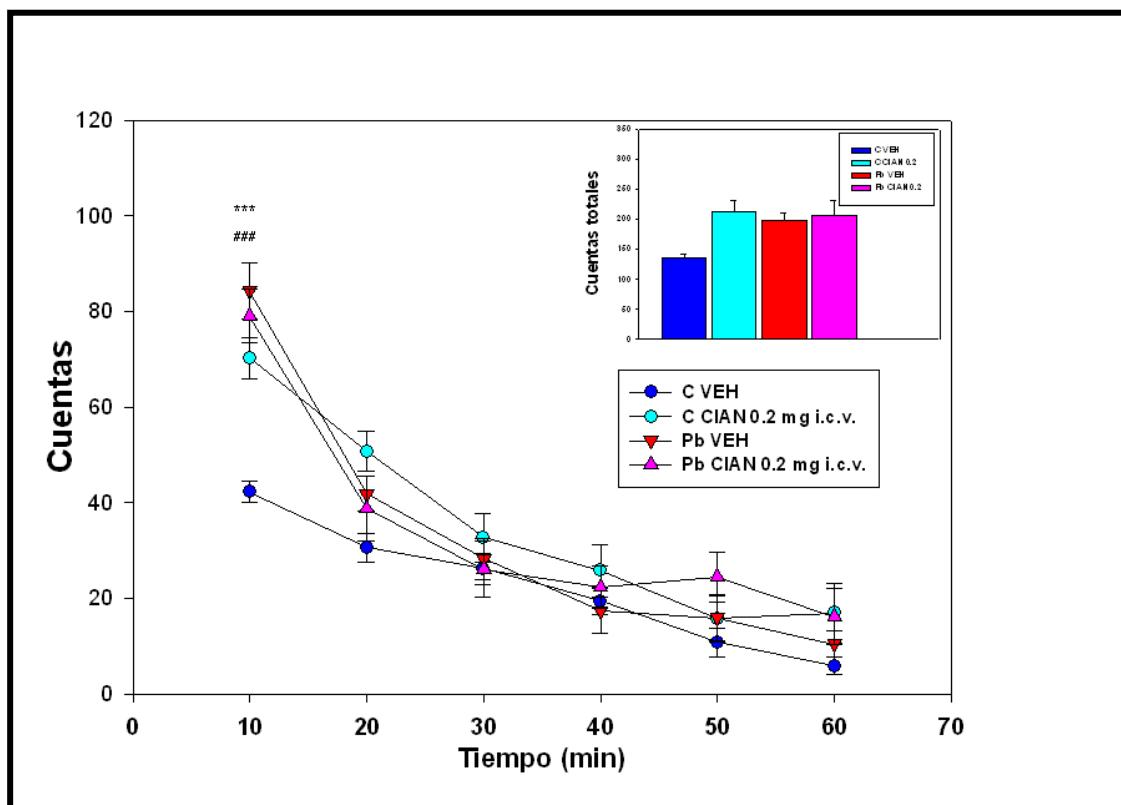


Figura 66: Efecto del consumo voluntario de ETOH en la actividad locomotora. La actividad locomotora se evaluó inmediatamente después del consumo de ETOH \* Indica diferencias entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH en  $***p<0,001$ . #Indica diferencias entre el grupo Pb-VEH y el grupo Pb-CIAN a  $***p<0,001$ . \*indica una diferencia entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH a  $**p<0,001$ . Animales totales en el grupo que estuvo sometido al consumo voluntario de ETOH: C-VEH=22; C-CIAN=16; Pb-VEH=20; Pb-CIAN=12.

### Consumo voluntario de Etanol:

#### Administración intracerebroventricular de cianamida (dosis 0,1 mg).

Una vez que el consumo se estabilizó durante los últimos 4 días (días 25-28) y siguiendo el mismo procedimiento empleado en las otras dosis se administraron vía i.c.v. 0,1 mg CIAN para evaluar si esta dosis era suficiente para producir un incremento del



consumo de ETOH en la actividad locomotora. En este caso, como en los experimentos anteriores, la sola exposición a Pb fue capaz de incrementar el consumo de ETOH como puede evidenciarse en el análisis estadístico del ANOVA de medidas repetidas de dos vías, que reveló un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,155)=99,64$ ;  $p<0,001$ , la variable repetida:  $F(5,155)=11,11$ ;  $p<0,001$ , y su interacción:  $F(5,155)=4,72$ ;  $p<0,01$  tal como puede observarse en la figura 66. La preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O durante el inicio del estudio reveló resultados similares. En efecto, el ANOVA de medidas repetidas de dos vías reveló un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,145)=69,15$ ;  $p<0,001$ , la variable repetida:  $F(5,145)=31,98$ ,  $p<0,001$  y de la interacción entre ambos:  $F(5,145)=3,07$ ,  $p<0,05$ . Con la administración de CIAN i.c.v. a la dosis de 0,1 mg, el análisis del ANOVA reveló un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,29)=52,05$ ;  $p<0,001$ , tratamiento  $F(1,29)=18,3$ ;  $p<0,001$  y la interacción entre ambos  $F(1,29)=5,5$ ;  $p<0,05$ , el cual fue significativo. Al igual que con la dosis de 0,2 mg en el grupo C (C-VEH vs C-CIAN), no se evidenció la tendencia que fue observada en el grupo Pb (Pb-VEH vs Pb-CIAN). En relación al análisis de la preferencia de ETOH/H<sub>2</sub>O, solo se demostró un efecto significativo de la variable grupo:  $F(1,29)=45,33$ ;  $p<0,001$ .

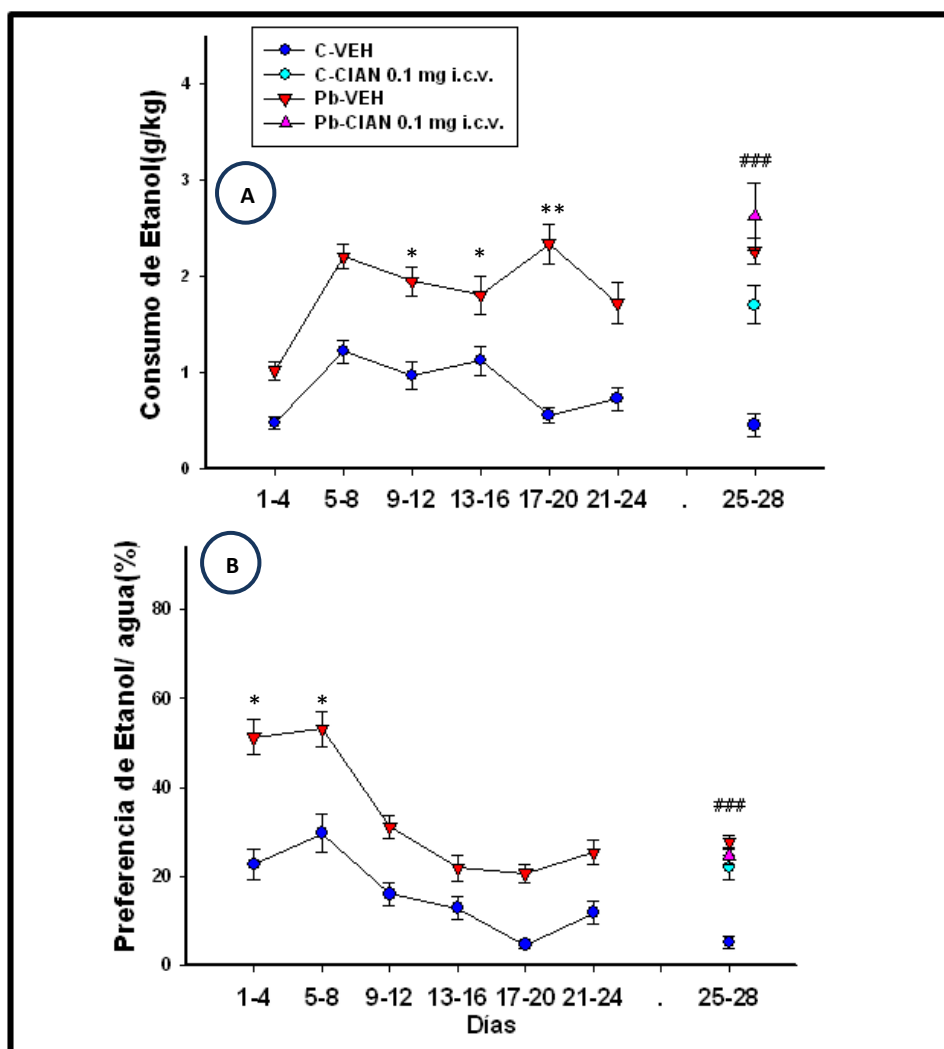


Figura 67: Consumo voluntario de etanol en respuesta a la administración central, i.c.v de CIAN (0,1mg i.c.v) A) expresado como g de ETOH por Kg de peso corporal y B) porcentaje de preferencia ETOH/H<sub>2</sub>O. Los datos (media + ES) fueron agrupados en bloques de 4 días a lo largo del eje horizontal, estos datos corresponden a las concentraciones de ETOH simbolizados como cilindros (días 1-4: 2%; días 5-8: 4%; días 9-12: 6%; días: 13-16 8%, y días 17-24: 10%. \* Indica diferencias en comparación con los C en  $p < 0,05$  y  $**p < 0,01$ . Administración de CIAN: #denota diferencias entre los SAL y los correspondientes grupos CIAN para C y animales expuestos a Pb con ###  $p < 0,001$ . C-VEH=11; C-CIAN i.c.v.=6; Pb-VEH=7; Pb-CIAN i.c.v.=6 animales por grupo.

### Actividad locomotora:

Los resultados obtenidos demuestran nuevamente que la administración de CIAN i.c.v. previo al esquema de consumo voluntario de ETOH provocó un incremento significativo en la actividad locomotora en los animales C en concordancia con el incremento del consumo voluntario en este grupo, tal como puede observarse en la figura 68. Con respecto a los animales expuestos a Pb no se observa un incremento significativo

en la actividad locomotora (en concordancia con el consumo de ETOH). En relación a la evaluación de las cuentas acumuladas cada 10 min o su suma total se observó una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos en la interacción grupo x tratamiento x tiempo:  $F(5,32)=4,66$ ;  $p<0,001$ .

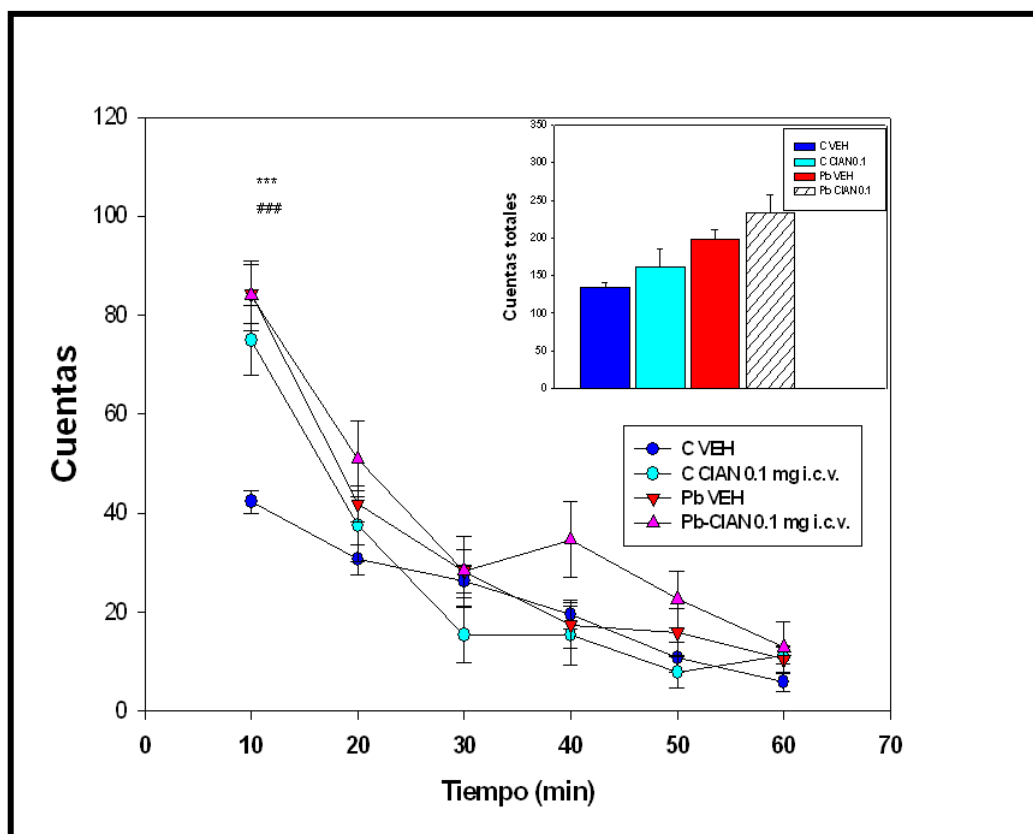


Figura 68: Efecto del consumo voluntario de ETOH en la actividad locomotora. La actividad locomotora se evaluó inmediatamente después del consumo de ETOH. \* Indica diferencias entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH en  $***p<0,001$ . #Indica diferencias entre el grupo Pb-VEH y el grupo Pb-CIAN  $###p<0,001$ . \*Indica una diferencia entre el grupo C y el grupo Pb infundido con VEH  $**p<0,001$ . Animales totales en el grupo que estuvo sometido al consumo voluntario de ETOH: C-VEH=22; C-CIAN=12; Pb-VEH=20; Pb-CIAN=14.

### Actividad enzimática de ALDH2:

Cabe destacar que la ALDH2 hepática analizada en el grupo DPN35 (antes del inicio del esquema de consumo de ETOH) no mostró diferencias entre los dos grupos (C=  $0,59 \pm 0,10$ ; Pb= $0,41 \pm 0,10$  min/mg de proteína/nmol NADH; n=5 para cada condición), figura 69A). La comparación de los datos de la actividad enzimática basal de ALDH2 hepática mediante un ANOVA de dos vías entre los grupos C y los animales expuestos al Pb, no evidenció un efecto significativo de grupo tal como se muestra en la figura 69 (B-C) como así tampoco en sus contrapartes noETOH. La administración

sistémica de CIAN (25 mg/Kg i.p.) como es de esperarse redujo considerablemente la actividad de ALDH2 en animales adultos independientemente de si han consumido ETOH o no, observándose en el análisis del ANOVA del grupo que consumió ETOH un efecto del tratamiento:  $F(1,27)=13,08$ ;  $p<0,05$ ; y para el grupo que no consumió de:  $F(1,17)=24,65$ ;  $p<0,0001$ . Los datos relacionados con la actividad enzimática cerebral de ALDH2 luego de la administración sistémica se representan en la figura 68 (D-E). Los resultados revelan que la actividad enzimática de ALDH2 no fue afectada en el cerebro entero cuando se administró CIAN de manera sistémica en animales con o sin ingesta de ETOH.

Por otro lado, como se muestra en la figura 70 la actividad enzimática cerebral de ALDH2 en respuesta a la administración i.c.v. de CIAN, mostró una drástica inhibición sólo en los animales C en el grupo que consumió ETOH (grupo x tratamiento:  $F(2,21)=10,39$ ;  $p<0,001$ ) que se correlaciona en parte con lo que se observa en ambas conductas evaluadas (consumo y locomoción), mientras que en los animales expuestos al Pb también en correlación con el consumo y la locomoción, sólo fue observada una tendencia; efecto que no se manifestó en los grupos que no han consumido ETOH.

En cuanto a la actividad enzimática de ALDH2 en distintas regiones cerebrales, los datos obtenidos se presentan en la tabla 6. La administración sistémica de CIAN provocó un efecto significativo de la variable tratamiento sólo en cerebelo:  $F(1,17)=4,49$ ;  $p<0,05$ , aunque el análisis *post hoc* no mostró diferencias entre los grupos que han consumido ETOH. En el caso de sus contrapartes noETOH, se observaron diferencias significativas en todos los parámetros del cerebelo, incluyendo efecto de grupo x tratamiento:  $F(1,14)=9,42$ ;  $p<0,01$  producto de una diferencia entre el grupo de Pb-SAL con todos los otros grupos. La tabla 6 muestra asimismo los datos de la actividad enzimática de ALDH2 en las distintas áreas cerebrales en respuesta a la microinfusión de CIAN 0,3 mg i.c.v. en animales que han consumido ETOH y sus contrapartes noETOH. Es de destacar que para fines estadísticos se analizaron todas las dosis de CIAN juntas (0, 0,1, 0,2, y 0,3 mg). Los resultados demuestran que no surgieron diferencias significativas en el análisis de la dosis de 0,3 mg para los animales que consumieron ETOH, sin embargo la excepción fue el hipocampo para la dosis de 0,2 mg en donde se observó un efecto de tratamiento x grupo:  $F(3,36)=5,98$ ;  $p<0,001$ . Con respecto a los animales que no consumieron ETOH, se encontraron efectos significativos en dos áreas, cerebelo, para la variable tratamiento:  $F(1,19)=20,3$ ;  $p<0,01$  e hipocampo

tratamiento:  $F(1,13)=6,49$ ;  $p<0,05$  y grupo:  $F(1,13)=4,92$ ;  $p<0,05$ , aunque la prueba Tuckey reveló sólo una diferencia en tratamiento para hipocampo ( $p<0,05$ ).

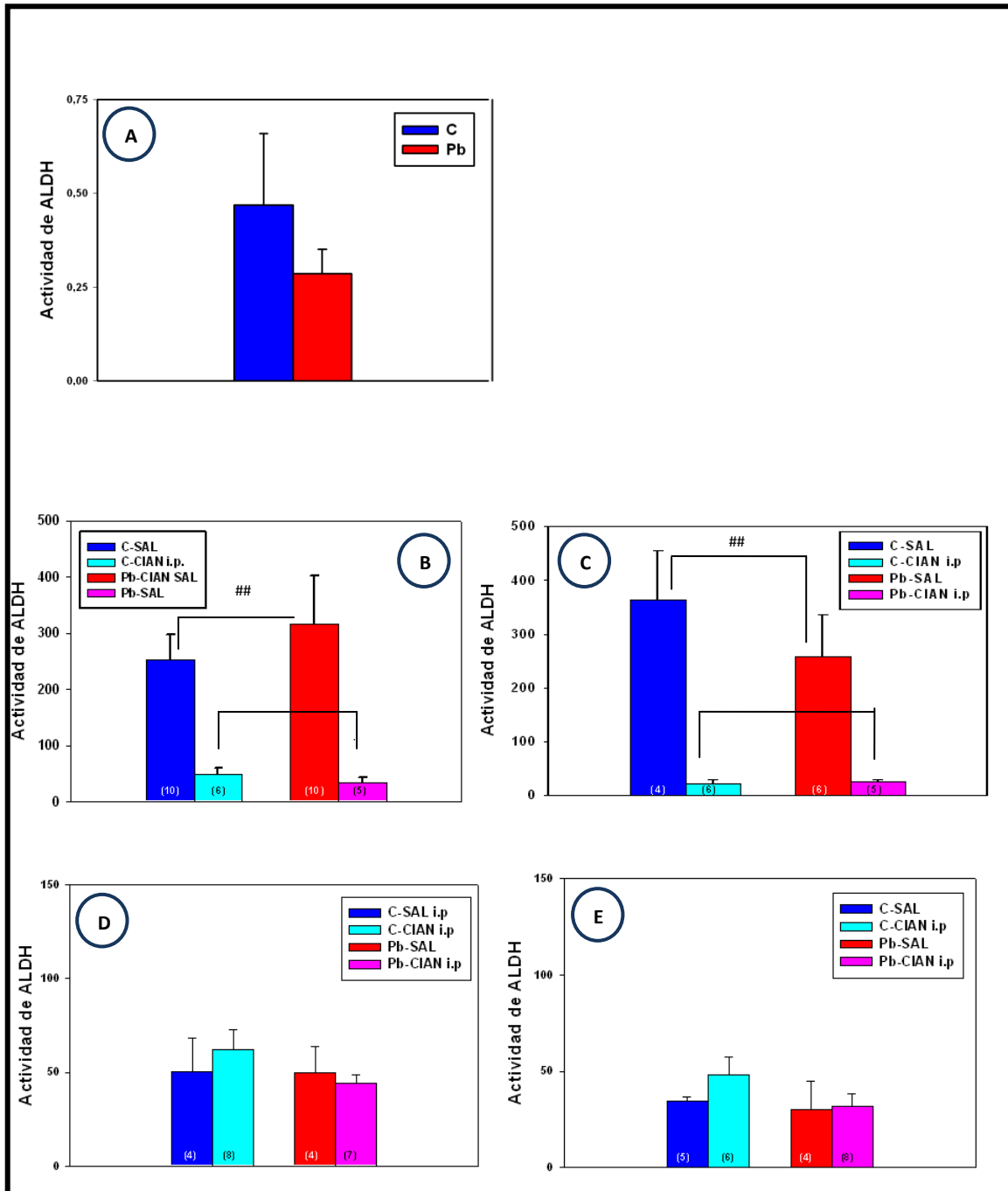


Figura 69: A) Actividad de ALDH hepática en animales en el DPN35. No se observaron diferencias significativas entre animales C y expuestos al Pb. C=5; Pb=5 animales por grupo. Actividad de ALDH en respuesta a la administración sistémica de CIAN (25 mg/kg i.p.). B-C) corresponden a niveles enzimáticos en hígado y D-E) corresponden a cerebro entero. #denota diferencias entre los animales inyectados con SAL y animales inyectados con CIAN para animales C y Pb para ##  $p<0,01$ , independientemente del consumo de ETOH. Cerebro: No surgieron diferencias entre las dos condiciones en los animales que han

consumido ETOH y en sus contrapartes noETOH. Los números entre paréntesis indican el número de animales por grupo.

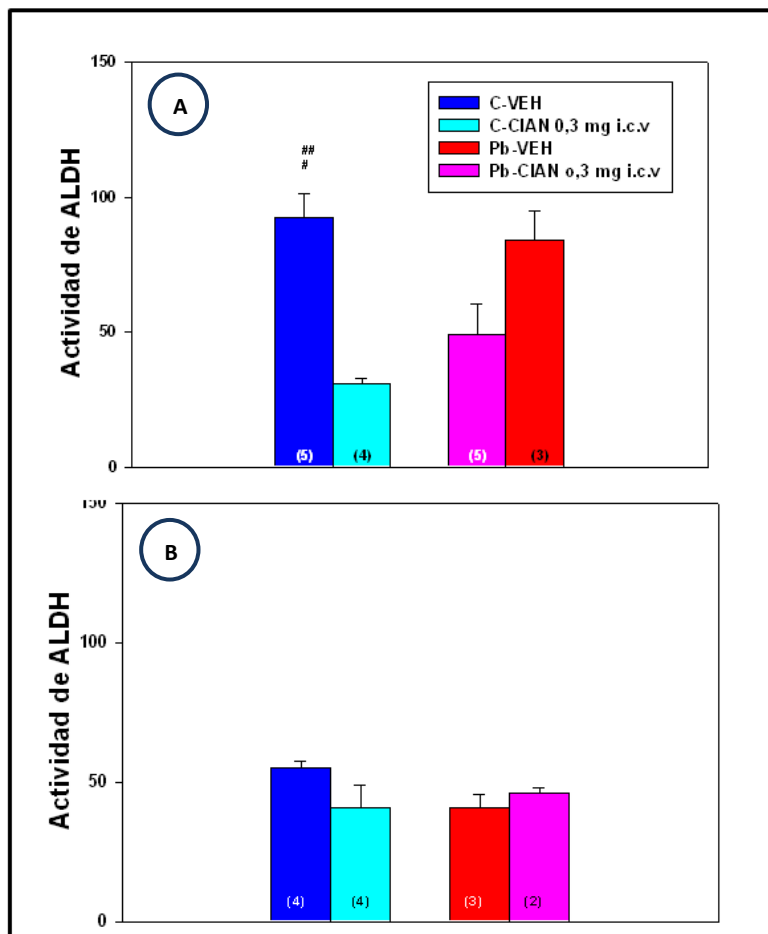


Figura 70: Actividad de ALDH en cerebro entero en respuesta a la administración central de CIAN (0,3 mg i.c.v.). A) animales que consumieron ETOH B) sus contrapartes noETOH. \*indica diferencias entre el grupo C y el grupo Pb inyectado con VEH en  $*p < 0,05$ ; #indica diferencias entre el grupo C-VEH y los grupos C-CIAN en  $##p < 0,01$ .

#### Actividad enzimática de catalasa:

En la figura 71A), se representa la actividad enzimática de CAT en sangre en los animales que estuvieron sometidos al esquema de ingesta de ETOH, mientras que en la figura 71B) se representan los datos de sus contrapartes noETOH. Como se informó anteriormente y reproduciendo estos datos se observa un efecto significativo de la variable de grupo:  $F(1,47)=35,93$ ,  $p < 0,001$ , lo cual evidencia una mayor actividad de CAT en sangre en los animales expuestos perinatalmente con Pb independientemente del tratamiento de la droga, en tanto que no se observaron diferencias en los grupos que no consumieron ETOH en cualquier condición. En el hígado, se observó una mayor actividad de CAT en el grupo de 35 días de edad en animales expuestos al Pb en

comparación con los C ( $C = 21,31 \pm 7,28$ ;  $Pb = 96,70 \pm 20,97$  mol  $H_2O_2$  descompuesto/mg de proteína/min:  $n = 4$  para cada grupo) tal como lo demuestra el análisis del ANOVA de una sola vía:  $F(1,13)=9,70$ ;  $p<0,05$ . En la edad adulta, y aunque una interacción de tratamiento x grupo reveló una diferencia significativa en los animales que consumieron ETOH:  $F(1,15)=5,51$ ;  $p<0,05$ ) cuando se efectuó la prueba de Tuckey no se observaron diferencias al igual que en los animales que no consumieron ETOH.

Por otra parte, en la figura 72 se puede observar que la administración sistémica de CIAN no fue capaz de inhibir o modificar la actividad cerebral de CAT, como así tampoco la actividad de la enzima ante la administración i.c.v. de 0,3 mg, independientemente de si el animal ha consumido ETOH o no.

En la tabla 7 puede observarse la actividad enzimática de CAT en áreas cerebrales como consecuencia de la administración periférica de CIAN. No se revelan diferencias significativas en ninguna región excepto en el núcleo accumbens (tratamiento:  $F(1,9)=5,73$ ;  $p<0,05$ ) y en corteza (grupo:  $p<0,05$ , y tratamiento:  $p<0,05$ ) de animales que no han consumido ETOH tras la administración sistémica de CIAN. En la misma tabla se muestran los datos para los animales que consumieron o no ETOH, y que fueron microinfectados con CIAN en i.c.v. El análisis estadístico reveló una interacción significativa en el núcleo accumbens de la variable tratamiento:  $F(1,45)=12,30$ ;  $p<0,001$  y de la interacción grupo x tratamiento:  $F(3,45)=3,18$ ;  $p<0,05$ . Por otra parte, se evidencia un efecto de tratamiento:  $F(3,47)=4,48$ ;  $p<0,05$  en el cuerpo estriado y el cerebelo:  $F(3,43)=3,27$ ;  $p<0,05$  de los animales que consumieron ETOH, mientras que en hipocampo se encontraron diferencias en grupo, tratamiento y su interacción ( $p<0,01$  cada uno). En el caso de sus contrapartes no ETOH, se evidenció una diferencia significativa en la interacción grupo x tratamiento en cuerpo estriado:  $F(1,21)=10,58$ ,  $p<0,01$  y no se encontró un efecto significativo del tratamiento en todas las demás áreas, excepto el núcleo accumbens ( $p<0,05$ ).

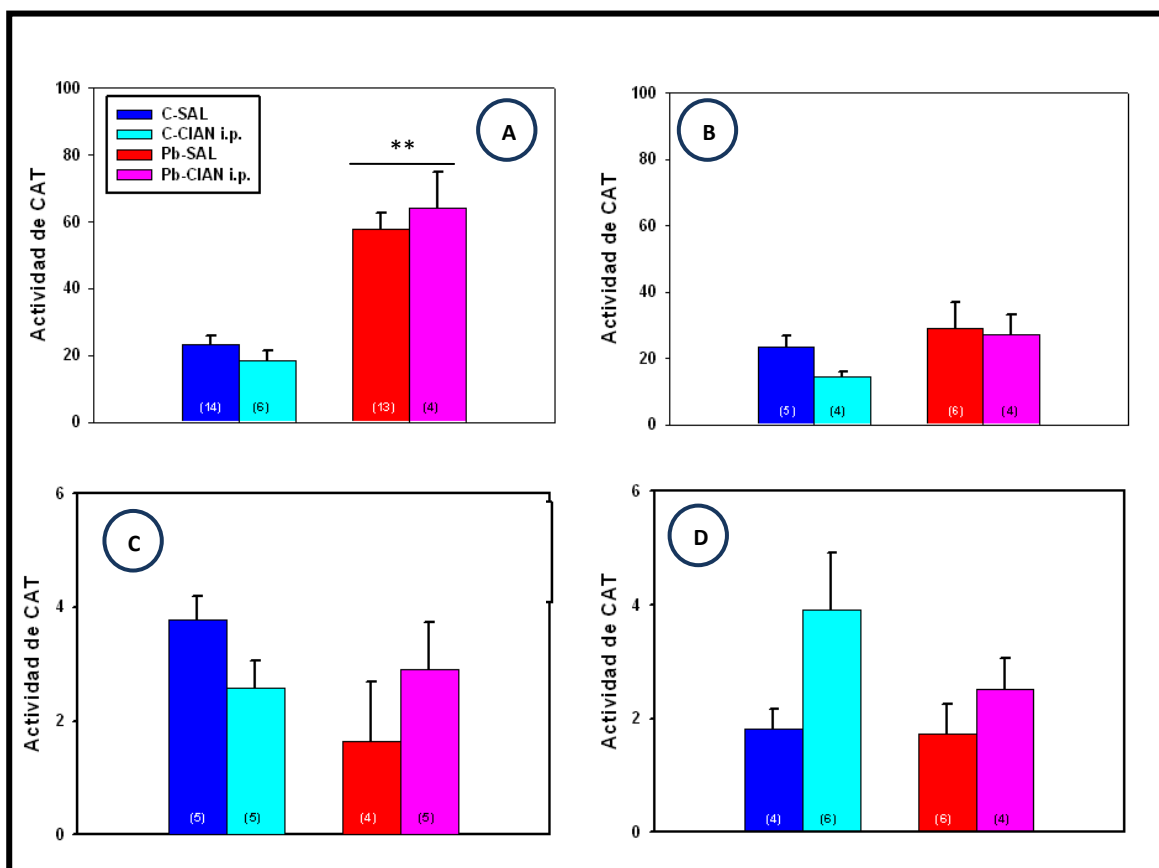


Figura 71: Actividad de CAT expresada en mmolH<sub>2</sub>O<sub>0</sub>/min/mg proteína en respuesta a la administración sistémica de CIAN (25mg/kg). A) sangre en animales que han consumido ETOH y B) en sus contrapartes noETOH. C) hígado en animales que han consumido ETOH y D) en sus contrapartes noETOH. Sangre: \* indica diferencias entre los grupos C y Pb independientemente del tratamiento con\*\*\*  $p < 0,001$  selectivamente en los animales que han consumido etanol. Hígado: no se observaron diferencias en ambos grupos ni en el tratamiento ni en la condición de consumo.



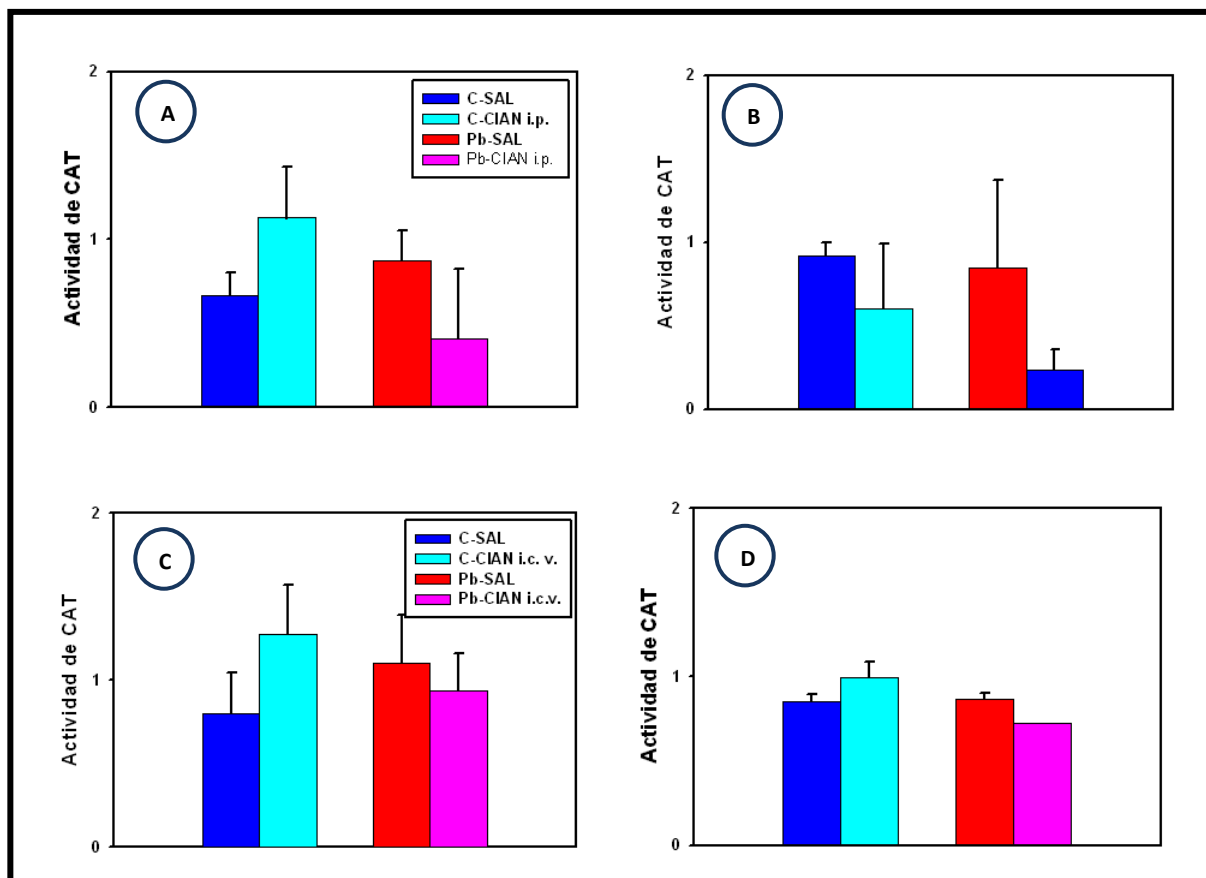


Figura 72: Actividad de CAT en cerebro entero expresado en  $\text{mmolH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  proteína: (A) en respuesta a la administración sistémica de CIAN (25 mg/kg) en animales que consumieron ETOH y (B) en sus contrapartes noETOH. (C) en respuesta a la administración central de CIAN (0,3 mg i.c.v.) en animales que han consumido ETOH y (D) en sus contrapartes noETOH. No se observaron diferencias en ninguna condición.





## Discusión

Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias relacionadas a los efectos opuestos que desencadena la acumulación de ACD como consecuencia de la inhibición de la ALDH2 por el tratamiento con CIAN ya sea administrada a nivel sistémico o central, induciendo cambios en los patrones de ingesta de ETOH tanto de C como de animales expuestos al Pb. Los resultados demostraron que la administración i.p. de CIAN fue capaz de inhibir significativamente la actividad hepática de ALDH2, con la consecuente acumulación periférica de ACD lo cual se produjo en paralelo con una marcada disminución del consumo voluntario de ETOH en animales expuestos al Pb y de la hiperlocomoción observada luego de la sesión de ingesta en estos animales. De manera interesante, en contraposición a lo observado con la administración periférica, la microinfusión de CIAN a nivel central indujo la inhibición de ALDH2 cerebral que presupone la acumulación de ACD que sería responsable del aumento de la ingesta de ETOH así como de la actividad locomotora en animales C y que en los animales expuestos a Pb se evidenció una tendencia en ambas conductas. Es importante recordar que los resultados observados en la actividad locomotora, reflejan el efecto que produce la administración de CIAN sobre el consumo voluntario de ETOH.

Estos datos destacan, en primer lugar la importancia de tomar en consideración el metabolismo oxidativo del ETOH en las conductas motivacionales y estimulantes asociadas al mismo. En segundo lugar, la relevancia de diferenciar los efectos producidos por la acumulación de ACD a nivel periférico (asociado con los efectos aversivos) y a nivel central (asociado con los efectos reforzantes). Y en tercer lugar, la importancia de los efectos del Pb durante el desarrollo en la iniciación del consumo de ETOH.

Como se ha mencionado anteriormente, el ACD ha sido clásicamente considerado un compuesto con propiedades tóxicas y aversivas, por lo que su acumulación en sangre es la base de las terapias farmacológicas contra el alcoholismo que utilizan drogas como el disulfiram y la CIAN. A nivel poblacional se ha observado en los individuos asiáticos que presentan una forma ineficiente ALDH2\*2, que conlleva a una acumulación periférica de este compuesto y a una serie de síntomas aversivos. En modelos animales se ha demostrado que la acumulación periférica de ACD es capaz de producir efectos depresivos y sedativos, manifestándose como una disminución de la actividad locomotora inducida por ETOH y como una supresión del consumo voluntario del mismo (Escarabajal y cols, 2002; Sanchis Segura y cols, 1999a; Tambour y cols, 2007). Se ha demostrado en correlación con estos resultados que la administración de un adenovirus

antisentido de ALDH2, fue capaz de producir una reducción sustancial en el consumo voluntario de ETOH en concordancia con una disminución de la actividad en hígado de ALDH2, asociado con un incremento en los niveles circulantes de ACD en plasma (Garver y cols, 2001; Ocaranza y cols, 2008). Sin embargo, se observó un efecto similar cuando se administró a nivel de ATV un vector lentiviral que codificaba para la enzima ALDH incrementando la habilidad de esta área de degradar el ACD, produciendo por lo tanto un incremento de la actividad de la enzima y una disminución de los niveles de ACD centrales evidenciando una marcada disminución del consumo de ETOH (80-95%), en animales *naive* (Karahanian y cols, 2014). Lo mismo se observó cuando se infundió en esta área un vector lentiviral shRNA anticatalasa, que llevo a una disminución del consumo voluntario de ETOH asociado en este caso a una disminución en la producción de ACD central (Karahanian y cols, 2011). Por lo tanto, puede evidenciarse que se observan resultados diferenciales y opuestos a nivel central y periférico con respecto a la generación y eliminación del ACD.

Es importante considerar que algunas evidencias demuestran que cuando los niveles de ACD en sangre son demasiado altos, o cuando la barrera metabólica que representa ALDH en la microvasculatura cerebral es ineficiente o se inhibe, se produce el ingreso de ACD hacia el SNC (Tabakoff y cols, 1976; Montón y cols, 1995). Por lo tanto, existe la posibilidad de que como consecuencia de la administración i.p. de CIAN, los niveles de ACD acumulados en la periférica puedan ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado por la técnica de microdiálisis que se produce una acumulación de ACD central tras la administración sistémica de CIAN, como consecuencia de la penetración del ACD proveniente de la periferia, o quizás como consecuencia de la inhibición local de ALDH cerebral (Jamal y cols, 2003b, 2007).

Sin embargo, en el modelo experimental de exposición a Pb usado en esta tesis, en el que la administración i.p. de CIAN con la consecuente inhibición de la ALHD2 hepática fue capaz de suprimir el alto consumo de ETOH, es muy probable que los efectos aversivos periféricos del ACD enmascaren los efectos reforzantes centrales y como consecuencia conduzcan a una drástica reducción de la ingesta de ETOH en los animales expuestos a Pb. La ausencia de tal efecto en los animales C, a pesar de que la enzima fue inhibida puede ser consecuencia de los reducidos valores de ingesta de ETOH, lo cual se asemeja a lo observado en sujetos humanos que no son alcohólicos. Los resultados obtenidos aquí como consecuencia de la administración i.p. de CIAN, concuerdan con los obtenidos por Sinclair y cols, 1980 en donde la administración de CIAN (200 o 40 mg/kg

de alimento) redujo la ingesta de ETOH y la actividad locomotora inducida por ETOH (Escarabajal y cols, 2002; Sanchis-Segura y cols, 1999a y Tambour y cols, 2007).

Por otra parte, contrastan los efectos producidos por la administración sistémica de CIAN con los obtenidos tras la administración central de la droga, en donde por el contrario se observa un incremento de la ingesta de ETOH y de la actividad locomotora luego de la sesión de consumo, efecto que es muy evidente en los animales C y una marcada tendencia en los animales expuestos a Pb. Algunos autores, entre ellos Sanchis-Segura (Sanchis-Segura y cols, 1999) sostienen que los efectos observados a nivel central se producirían por el efecto de la inhibición de la CIAN sobre la actividad de CAT. Sin embargo en nuestro estudio CIAN se administró 30 min antes de la disponibilidad de ETOH, se ha demostrado que cuando se incuban juntos (ETOH y CIAN) o en un tiempo breve uno de otro, la actividad peroxidica de CAT que puede ser inhibida por CIAN es protegida por la administración de ETOH (DeMaster et al, 1985; Cederbaum y Dicker, 1985). Lo cual se evidencia en la medición de la actividad de CAT que no presentó modificaciones en hígado, en cerebro entero ni en las aéreas cerebrales (ver sección de resultados).

Es importante destacar que, tal como lo demuestra la figura 69 B-C, la administración sistémica de CIAN afectó principalmente la actividad de la ALDH2 presente en el hígado, mientras que la actividad de ALDH2 de cerebro no fue modificada por esta administración periférica (figura 69 D-E ), lo que demostraría que CIAN no atravesaría la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, bajo estas condiciones, podemos deducir que en nuestro trabajo la inhibición de ALDH2 con la consecuente acumulación de ACD se produjo de manera local tanto en el cerebro como en el hígado.

Así como se ha demostrado que la acumulación periférica de ACD produce efectos aversivos, en contraposición y cuando el ACD es administrado ya sea i.c.v (Correa y cols, 2003), en la sustancia negra (Arizzi-La France y cols, 2006), intra VTA (Sánchez-Catalán y cols, 2005) o en el núcleo arcuato hipotalámico (Pastor y Aragón 2008; Correa y cols, 2009), produce un incremento de la actividad locomotora, del consumo voluntario de ETOH, de la autoadministración y condicionamiento asociado a un sitio. Mientras que en el cerebro la inactivación de ACD disminuye el consumo de ETOH (Font y cols, 2006), estas evidencias apoyarían la idea de que el ACD es un metabolito centralmente activo del ETOH (Amit y cols, 1980; Aragón y cols, 1986; Sanchis y Aragón 2007), y proporciona una prueba más a la hipótesis de que ETOH sería un profármaco que ejercería sus efectos mediante este metabolito (Quertermont y cols, 2005).

Por lo tanto, podemos concluir que ya sea la sobreactivación de CAT (resultados que se mostraron en el capítulo II) o la inactivación de ALDH2 a nivel cerebral, que producen un incremento cerebral de ACD (el presente capítulo) provocan una mayor ingesta de ETOH y una hiperlocomoción posterior como resultado de este incremento en el consumo. Sin embargo, en el caso de la administración CIAN la reducción de la actividad ALDH2 y el incremento del consumo de ETOH seguido de una hiperlocomoción, se observó marcadamente en los animales C mientras que los efectos fueron menos evidentes en el grupo de animales que ya contaba con una historia previa de consumo elevado de ETOH. No obstante, la actividad ALDH2 cerebral sólo se redujo en el grupo C cuando CIAN fue microinfundida en el SNC (en todas las dosis estudiadas), resultado que explicaría la elevación en la ingesta de ETOH y la hiperlocomoción en los animales C con respecto a los del grupo Pb. Por el contrario, la administración sistémica de CIAN redujo significativamente la ingesta de ETOH selectivamente en animales expuestos a Pb llegando a un nivel similar a los C, efecto asociado a una disminución de la actividad de ALDH2 en hígado en ambos grupos. Al respecto, se ha reportado que la actividad de ALDH cerebral, más que la hepática, se correlacionaría mejor con el consumo voluntario de ETOH (Amit y cols, 1978).

En conclusión, cuando CIAN es administrada sistémicamente, con la consecuente inhibición preferencial de la ALDH2 hepática lo que conlleva a una acumulación periférica de ACD, se evidencia una disminución del consumo y de la actividad locomotora de los animales expuestos al Pb. Al respecto, hemos postulado que esta acumulación periférica de ACD, sería el principal responsable de estos efectos aversivos. Si bien algunos autores, sostienen que este efecto se produciría más por una inhibición de CAT central, al respecto hemos demostrado que la actividad de la enzima no se encuentra modificada ni en hígado ni en cerebro luego de la administración de CIAN. Por otra parte, a pesar de que la actividad tanto de CAT como de ALDH2 cerebral no se encuentra modificada y como consecuencia de la ausencia de medición de los niveles de ACD central no podemos concluir que éstos no se encuentren incrementados. Sin embargo, luego de la administración central de la droga que evita los efectos aversivos periféricos, observamos los efectos estimulantes del ACD a nivel central, con el consecuente incremento de la actividad de la ALDH2 cerebral como del consumo voluntario de ETOH y de la locomoción. Por lo que quizás la administración sistémica de CIAN, que conlleva a una acumulación periférica de ACD, con sus consecuentes efectos supresores sobre el consumo podría estar enmascarando los efectos estimulantes del ACD

en caso de que se produzca un incremento a nivel central. Estos efectos estimulantes fueron evidenciados tras la administración i.c.v. de la droga. De esta manera, podemos observar, cómo este balance entre los niveles de ACD formado en la periferia y a nivel central podría estar determinando y ser responsable de la cantidad de ETOH consumido (y de los efectos estimulantes del mismo).

*Conclusión parcial: La inhibición de ALDH2 (y por lo tanto la acumulación de ACD de manera indirecta) fue capaz de modificar el patrón de consumo voluntario y la actividad locomotora. Cuando la inhibición se realizó a través de la administración sistémica de CLAN, el consumo voluntario de ETOH fue suprimido en el grupo expuesto a Pb. Mientras que cuando se administró CLAN intracerebralmente, se observó un incremento del consumo en ambos grupos (principalmente en el grupo C).*



		<i>ETOH</i>				<i>noETOH</i>			
		<i>SAL</i>	<i>CIAN i.d.</i>	<i>VEH</i>	<i>CIAN i.c.v.</i>	<i>SAL</i>	<i>CIAN i.d.</i>	<i>VEH</i>	<i>CIAN i.c.v.</i>
<b>Cerebelo</b>	C	17,55 ± 2,59 <sup>(6)</sup>	3,41 ± 1,18 <sup>(4)</sup>	10,74 ± 2,27 <sup>(8)</sup>	9,58 ± 2,74 <sup>(6)</sup>	14,18 ± 4,22 <sup>(4)</sup>	6,11 ± 3,22 <sup>(4)</sup>	18,74 ± 1,77 <sup>(4)</sup>	5,13 ± 1,37 <sup>(10)</sup>
	Pb	16,12 ± 6,84 <sup>(4)</sup>	9,23 ± 0,98 <sup>(5)</sup>	7,73 ± 0,72 <sup>(6)</sup>	13,70 ± 6,88 <sup>(3)</sup>	29,72 ± 9,10 <sup>(2)</sup> <sup>a</sup>	6,10 ± 0,90 <sup>(5)</sup>	16,78 ± 5,43 <sup>(4)</sup>	8,10 ± 0,89 <sup>(5)</sup>
<b>Corteza Frontal</b>	C	7,94 ± 5,38 <sup>(4)</sup>	14,21 ± 4,84 <sup>(4)</sup>	6,91 ± 4,91 <sup>(3)</sup>	0,00 ± ---- <sup>(1)</sup>	2,20 ± 1,57 <sup>(4)</sup>	26,18 ± 1,63 <sup>(2)</sup>	13,69 ± 3,25 <sup>(2)</sup>	22,76 ± 0,00 <sup>(1)</sup>
	Pb	7,73 ± 3,50 <sup>(2)</sup>	9,29 ± 4,58 <sup>(5)</sup>	5,10 ± 3,30 <sup>(2)</sup>	6,62 ± 0,77 <sup>(2)</sup>	12,47 ± 6,50 <sup>(4)</sup>	4,31 ± 2,25 <sup>(4)</sup>	2,73 ± ---- <sup>(1)</sup>	6,06 ± ---- <sup>(1)</sup>
<b>Hipocampo</b>	C	5,41 ± 0,89 <sup>(6)</sup>	9,74 ± 2,00 <sup>(5)</sup>	3,24 ± 0,94 <sup>(5)</sup>	2,40 ± 1,03 <sup>(5)</sup>	9,59 ± 2,70 <sup>(5)</sup>	6,78 ± 2,70 <sup>(4)</sup>	7,81 ± 7,81 <sup>(3)</sup> <sup>a</sup>	5,37 ± 1,88 <sup>(5)</sup>
	Pb	12,39 ± 3,54 <sup>(5)</sup>	11,32 ± 3,06 <sup>(7)</sup>	4,66 ± 1,43 <sup>(5)</sup>	6,81 ± 1,06 <sup>(5)</sup>	13,98 ± 4,50 <sup>(8)</sup>	2,66 ± 1,20 <sup>(6)</sup>	27,06 ± 8,45 <sup>(3)</sup>	6,32 ± 2,43 <sup>(6)</sup>
<b>Estriado</b>	C	9,27 ± 5,06 <sup>(3)</sup>	3,34 ± 2,00 <sup>(3)</sup>	4,28 ± 2,14 <sup>(3)</sup>	8,74 ± ---- <sup>(1)</sup>	4,02 ± ---- <sup>(1)</sup>	2,73 ± 1,38 <sup>(4)</sup>	5,21 ± 2,53 <sup>(2)</sup>	11,52 ± 2,06 <sup>(2)</sup>
	Pb	6,77 ± 2,57 <sup>(3)</sup>	6,83 ± 1,54 <sup>(3)</sup>	4,14 ± 2,51 <sup>(3)</sup>	19,97 ± ---- <sup>(1)</sup>	0,00 ± ---- <sup>(1)</sup>	6,31 ± 2,52 <sup>(4)</sup>	2,47 ± ---- <sup>(1)</sup>	8,60 ± ---- <sup>(1)</sup>
<b>Hipotalamo</b>	C	0,00 ± 0,00 <sup>(3)</sup>	6,26 ± 3,00 <sup>(2)</sup>	9,11 ± 3,76 <sup>(2)</sup>	7,38 ± 1,95 <sup>(3)</sup>	14,95 ± 6,93 <sup>(5)</sup>	1,18 ± 0,71 <sup>(3)</sup>	---- ± ---- <sup>(0)</sup>	5,68 ± 1,64 <sup>(2)</sup>
	Pb	12,56 ± 5,94 <sup>(5)</sup>	8,77 ± 6,43 <sup>(4)</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>(2)</sup>	16,70 ± 0,21 <sup>(2)</sup>	20,21 ± 5,44 <sup>(2)</sup>	4,93 ± 3,15 <sup>(3)</sup>	---- ± ---- <sup>(0)</sup>	5,39 ± ---- <sup>(1)</sup>
<b>N. Accumbens</b>	C	16,18 ± 12,00 <sup>(3)</sup>	6,38 ± 1,60 <sup>(3)</sup>	13,67 ± 8,34 <sup>(2)</sup>	3,31 ± ---- <sup>(1)</sup>	8,68 ± ---- <sup>(1)</sup>	9,28 ± 3,53 <sup>(2)</sup>	5,20 ± 2,61 <sup>(2)</sup>	---- ± ---- <sup>(0)</sup>
	Pb	10,24 ± 6,99 <sup>(3)</sup>	24,46 ± 7,63 <sup>(3)</sup>	3,84 ± 0,12 <sup>(2)</sup>	5,78 ± 1,18 <sup>(2)</sup>	2,78 ± 0,66 <sup>(3)</sup>	8,57 ± 3,00 <sup>(3)</sup>	14,76 ± 9,85 <sup>(2)</sup>	---- ± ---- <sup>(0)</sup>

Tabla 6: Actividad de ALDH cerebral expresada en nmol NADH/min/mg de proteína. Los números entre paréntesis indican el número de animales por grupo.

<sup>a</sup> en cerebelo, del grupo ETOH Pb-SAL es significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) comparado con todos los otros grupos. <sup>a</sup> hipocampo, del grupo noETOH C y Pb VEH son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) del grupo inyectado con CIAN.

		<i>Etoh</i>				<i>noETOH</i>			
		<i>SAL</i>	<i>CIAN i.p.</i>	<i>VEH</i>	<i>CIAN i.c.v.</i>	<i>SAL</i>	<i>CIAN i.p.</i>	<i>VEH</i>	<i>CIAN i.c.v.</i>
<b>Cerebelo</b>	C	1,18 ± 0,19 <sup>(5)</sup>	0,73 ± 0,46 <sup>(4)</sup>	0,86 ± 0,26 <sup>(14)</sup>	0,42 ± 0,18 <sup>(6)</sup>	1,04 ± 0,45 <sup>(4)</sup>	2,99 ± 1,74 <sup>(3)</sup>	1,16 ± 0,45 <sup>(7)</sup>	2,57 ± 0,26 <sup>(4)</sup>
	Pb	1,07 ± 0,25 <sup>(8)</sup>	1,49 ± 0,36 <sup>(10)</sup>	1,44 ± 0,37 <sup>(16)</sup>	2,07 ± 0,54 <sup>(8)</sup>	2,98 ± 1,55 <sup>(4)</sup>	4,84 ± 1,10 <sup>(5)</sup>	0,71 ± 0,15 <sup>(10)</sup>	1,97 ± 0,56 <sup>(4)</sup>
<b>Corteza Frontal</b>	C	2,60 ± 0,72 <sup>(5)</sup>	1,22 ± 0,35 <sup>(4)</sup>	1,12 ± 0,19 <sup>(14)</sup>	0,40 ± 0,11 <sup>(7)</sup>	1,09 ± 0,36 <sup>(6)</sup>	2,00 ± 1,30 <sup>(3)</sup>	2,66 ± 0,46 <sup>(7)</sup>	1,20 ± 0,22 <sup>(4)</sup>
	Pb	3,50 ± 1,15 <sup>(9)</sup>	1,04 ± 0,33 <sup>(8)</sup>	1,27 ± 1,19 <sup>(16)</sup>	1,75 ± 0,45 <sup>(9)</sup>	1,88 ± 0,65 <sup>(4)</sup>	6,52 ± 2,11 <sup>(4)</sup>	4,45 ± 1,22 <sup>(9)</sup>	4,83 ± 1,92 <sup>(2)</sup>
<b>Hipocampo</b>	C	0,87 ± 0,38 <sup>(5)</sup>	0,57 ± 0,25 <sup>(4)</sup>	0,51 ± 0,14 <sup>(14)</sup>	0,29 ± 0,06 <sup>(9)</sup>	2,41 ± 1,15 <sup>(5)</sup>	2,41 ± 0,79 <sup>(4)</sup>	0,99 ± 0,29 <sup>(7)</sup>	1,61 ± 0,50 <sup>(3)</sup>
	Pb	0,78 ± 0,17 <sup>(8)</sup>	0,89 ± 0,23 <sup>(9)</sup>	1,15 ± 0,38 <sup>(16)</sup>	2,15 ± 1,51 <sup>(8)</sup>	0,89 ± 0,48 <sup>(4)</sup>	1,97 ± 0,77 <sup>(5)</sup>	1,42 ± 0,21 <sup>(9)</sup>	2,58 ± 0,84 <sup>(3)</sup>
<b>Estriado</b>	C	1,78 ± 0,69 <sup>(5)</sup>	0,69 ± 0,42 <sup>(4)</sup>	1,74 ± 0,38 <sup>(12)</sup>	0,42 ± 0,11 <sup>(8)</sup>	3,99 ± 3,23 <sup>(4)</sup>	1,99 ± 1,16 <sup>(3)</sup>	3,72 ± 1,10 <sup>(7)</sup>	4,37 ± 1,08 <sup>(3)</sup>
	Pb	2,75 ± 0,70 <sup>(9)</sup>	1,80 ± 0,80 <sup>(7)</sup>	0,97 ± 0,19 <sup>(16)</sup>	1,75 ± 0,94 <sup>(9)</sup>	2,30 ± 0,75 <sup>(5)</sup>	6,35 ± 1,40 <sup>(4)</sup>	2,17 ± 0,53 <sup>(10)</sup>	10,62 ± 1,29 <sup>(2)</sup>
<b>Hipotalamo</b>	C	3,06 ± 0,43 <sup>(3)</sup>	1,36 ± 0,27 <sup>(4)</sup>	0,8 ± 0,20 <sup>(8)</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>(2)</sup>	0,37 ± 0,21 <sup>(3)</sup>	2,19 ± 0,75 <sup>(3)</sup>	2,26 ± 0,50 <sup>(7)</sup>	4,45 ± 1,31 <sup>(4)</sup>
	Pb	2,86 ± 1,20 <sup>(3)</sup>	0,63 ± --- <sup>(1)</sup>	1,08 ± 0,22 <sup>(8)</sup>	5,43 ± 0,46 <sup>(2)</sup>	1,20 ± 0,20 <sup>(3)</sup>	1,08 ± 0,54 <sup>(3)</sup>	2,10 ± 0,83 <sup>(10)</sup>	6,26 ± 0,92 <sup>(4)</sup>
<b>N. Accumbens</b>	C	3,17 ± 1,01 <sup>(5)</sup>	1,72 ± 0,72 <sup>(4)</sup>	1,45 ± 0,34 <sup>(14)</sup>	0,60 ± 0,09 <sup>(8)</sup>	1,11 ± 0,38 <sup>(4)</sup>	7,04 ± 2,34 <sup>(4)</sup>	2,49 ± 0,64 <sup>(6)</sup>	1,54 ± 0,26 <sup>(4)</sup>
	Pb	2,06 ± 0,83 <sup>(7)</sup>	1,14 ± 0,53 <sup>(7)</sup>	0,99 ± 0,20 <sup>(16)</sup>	2,37 ± 0,93 <sup>(9)</sup>	1,70 ± 0,58 <sup>(4)</sup>	4,34 ± 2,18 <sup>(3)</sup>	2,61 ± 0,59 <sup>(10)</sup>	4,64 ± 1,65 <sup>(3)</sup>

Tabla 7: Actividad cerebral de CAT expresada como mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml/mg de proteína. Los números entre paréntesis indican el número de animales por grupo. Corteza frontal, hipocampo y Nac de los grupos noETOH-SAL son diferentes a <sup>a</sup>*p*< 0.05 y en cerebelo a <sup>b</sup>*p*< 0.01 comparados con los animales inyectados con CIAN i.p.. Corteza frontal de los animales expuestos a Pb son diferentes del grupo C a <sup>c</sup>*p*< 0.05. Estriado en el grupo Pb-CIAN i.c.v. es significativamente diferente a <sup>d</sup>*p*< 0.05 comparado con los otros grupos.



# CONCLUSIONES FINALES

## CONCLUSIONES FINALES

Las evidencias presentadas en este trabajo de tesis permiten concluir la existencia de una impronta que se produce en los animales como consecuencia de la exposición a Pb durante el desarrollo, lo cual en etapas posteriores de la vida podría ser condicionante para la reactividad de estos animales frente a determinadas situaciones relacionadas a conductas adictivas, como el inicio del consumo voluntario de ETOH. Uno de los factores determinantes de esta interrelación, es la actividad enzimática y la expresión de CAT y, por consiguiente, la acumulación de ACD en determinadas aéreas relacionadas con estas conductas. Por lo tanto, esta tesis aporta evidencias de la existencia de una estrecha relación entre la exposición a Pb durante la edad temprana, la actividad de CAT/ acumulación de ACD y el consumo voluntario de ETOH.

En nuestro trabajo pudimos observar (sección II) que los animales expuestos a Pb presentan, a los 35 días de edad, una mayor actividad eritrocitaria basal de CAT en relación a sus respectivos controles, la cual se encuentra potenciada tras el esquema de consumo voluntario de ETOH, situación que no se evidenció en animales que no han consumido la droga. De manera similar, observamos que la actividad cerebral de CAT se correlacionó positivamente con el consumo voluntario de ETOH, lo cual no se observó en la actividad hepática de CAT (secciones II y III). Relacionado a esto, el tratamiento tanto con un inhibidor de la actividad de la enzima (AT) como así también con un vector shRNA antiCAT (que inhibe de manera específica la síntesis de ARN de la proteína CAT- sección IV-), fue capaz de revertir el mayor consumo observado en ratas expuestas a Pb. Lo opuesto ocurrió con la sobreactivación de la enzima (con 3NPA) en donde, de manera interesante, se produjo un incremento no sólo en el grupo expuesto a Pb que presentó una historia previa de consumo elevado de ETOH, sino también en el grupo control que no la evidenció (sección II). En consecuencia, se podría concluir que la actividad de CAT estaría determinando los niveles de ingesta de ETOH.

En relación al abordaje de la actividad de la enzima ALDH2, se ha demostrado que CIAN ejerce una inhibición preferencial sobre la ALDH hepática en relación a la cerebral, tal como se evidencia en nuestro trabajo con la administración sistémica de la droga al disminuir la actividad de ALDH hepática sin afectar la ALDH cerebral (sección VI). Como consecuencia de esto, se observó una disminución del consumo de ETOH (sólo en el grupo expuesto a Pb), lo cual podría asociarse indirectamente a una

acumulación periférica de ACD en el grupo que evidenció un consumo excesivo de la droga. Lo opuesto observamos al administrar CIAN intracerebralmente, en donde la inhibición de la ALDH cerebral indujo un incremento del consumo voluntario en ambos grupos, aunque en mayor medida en el grupo control, resultados que pueden ser complementados con la medición de los niveles cerebrales de ACD.

Así, a partir de los resultados presentados en este trabajo de tesis, la manipulación de los sistemas enzimáticos involucrados en la oxidación del ETOH, permitirían afirmar no sólo la existencia e importancia de su metabolismo a nivel central sino también del papel del ACD como uno de los principales responsables de los efectos motivacionales de ETOH. Al respecto, los sistemas enzimáticos implicados tanto en la formación como la degradación del ACD (CAT cerebral responsable de la generación de la mayor parte del ACD a nivel central y ALDH responsable de la degradación de ACD a nivel central como periférico) son decisivos para la expresión conductual de las acciones psicofarmacológicas del ETOH.

Por otra parte, se ha demostrado que existe una distribución diferencial de CAT en cerebro en ciertas estructuras. Esto fue evidenciado a través de los resultados de inmunohistoquímica de esta tesis (Sección III), en los que reportamos un patrón de expresión diferencial de acuerdo a la edad postnatal, de acuerdo al tratamiento perinatal (Control *vs* Pb), a la condición de consumo de ETOH (ETOH *vs* noETOH) y al tratamiento farmacológico (especialmente observado con AT). Esto sugiere que el ACD formado a través de CAT se acumularía en ciertas estructuras donde ésta se encuentra en mayor abundancia, lo cual sugiere que si bien los niveles de ACD en cerebro son bajos en comparación con los hepáticos, sean suficientes para activar la maquinaria neuronal responsable de los efectos farmacológicos del ETOH.

Demostremos además que los animales expuestos a Pb presentan una mayor autoadministración de ETOH en comparación con los controles. Los resultados obtenidos con el paradigma de conducta operante aportan evidencias que apoyan la noción de que los animales expuestos al Pb presentan una mayor susceptibilidad a las propiedades motivacionales de ETOH. Estos resultados reproducen los obtenidos en el consumo de ETOH, evidenciándose en ambos paradigmas una mayor autoadministración de ETOH de los animales expuestos a Pb en relación con los controles (sección V), lo cual reflejaría una aumentada vulnerabilidad a las propiedades adictivas de ETOH.

En resumen, los resultados obtenidos de este trabajo de tesis doctoral, proveen evidencias que apoyan la idea de que en la oxidación central del ETOH a través de CAT, tendría un rol preponderante en la formación central de ACD, que estaría actuando como predictor/modulador de la ingesta de ETOH en ratas expuestas perinatalmente a dosis de Pb que no producen manifestaciones subclínicas detectables. En este modelo, la enzima ALDH también desempeñaría un papel fundamental al estar implicada en la degradación de ACD. Estos datos permitirían deducir que la presencia de Pb a nivel cerebral al principio de las pruebas, la iniciación del consumo en la adolescencia, o la huella neurotóxica causada por la exposición al metal durante el desarrollo, podrían ser responsables de alteraciones permanentes relacionadas con los patrones de consumo del ETOH.

Podemos concluir entonces que la exposición al Pb fue capaz de modificar los efectos farmacológicos del ETOH, resultando las alteraciones encontradas en estos animales con niveles sanguíneos de Pb en donde no observan manifestaciones clínicas evidentes de la exposición (tanto en madres y crías como en animales adultos) y que se encuentran cercanos a los límites considerados como seguros por los CDC (sección I), lo cual le otorga una perspectiva clínica a nuestro modelo. Así, estos resultados proveen evidencias adicionales sobre la relevancia de la exposición a Pb durante el desarrollo en el impacto frente a situaciones o eventos desafiantes en el futuro del individuo que condicionaran su capacidad para afrontarlos y serán determinantes en las respuestas adaptativas a largo plazo. Concretamente, en este trabajo hemos abordado como las bases neurales de la adicción a ETOH y sus manifestaciones conductuales pueden ser moldeadas por la exposición temprana a Pb, un contaminante ambiental que aún hoy, y luego de numerosas políticas de regulación, sigue ejerciendo efectos neurotóxicos durante el desarrollo.

# REFERENCIAS



- Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1992) . Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetics*. 2:2. 48-62.
- Ahamed M, Verma S, Kumar A, Siddiqui MK. (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Sci Total Environ* 346: 48-55.
- Alessio, Helaine M., Hagerman, Ann E. (2006). *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. Imperial College.
- Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD and Hughes PE (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 60, 409-470.
- Amit, Z. y Stern, H. M. (1971) A further investigation of alcohol preference in the laboratory rat induced by hypothalamic stimulation. *psychopharmacology* 21:317-327.
- Amit, Z., Levitan, D.E., Lindros, K.O., (1976). Suppression of ethanol intake following administration of dopamine-beta-hydroxylase inhibitors in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 223, 114-119.
- Amit, Z., Brown, Z.W., Rockman, G.E., (1977). Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration. *Drug Alcohol Depend.* 2, 495-500.
- Amit, Z., Smith, B.R., (1985). A multi-dimensional examination of the positive reinforcing properties of acetaldehyde. *Alcohol* 2, 367-370.
- Amit, Z; Aragon, C.M.G; Smith, B.R. (1986). Alcohol metabolizing enzymes as possible markers mediating voluntary consumption. *Canadian J. Public Health*, 77:15-20.
- Amit, Z., Aragon, C.M., (1988). Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary ethanol consumption: possible evidence for a biological marker system of ethanol intake. *Psychopharmacology* 95, 512-515.
- Amit, Z., Smith, B.R., Weiss, S., (1999). Catalase as a regulator of the propensity to ingest alcohol in genetically determined acatalasemic individuals from Israel. *Addict. Biol.* 4, 215-221.
- Antikiewicz-Michaluk, L., Romańska, I., Papla, I., Michaluk, J., Bakalarz, M., Vetulani, J., Krygowska-Wajs, A., Szczudlik, A., (2000). Neurochemical changes induced by acute and chronic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol in dopaminergic structures of rat brain. *Neuroscience* 96, 59-64.
- Aragon, C.M.G; Amit, Z. (1985). A two dimensional model of alcohol consumption: Possible interaction of brain catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 2:357-360.
- Aragón, C.M., Spivak, K., Amit, Z., (1985a). Blockade of ethanol induced conditioned taste aversion by 3-amino-1,2,4-triazole: evidence for catalase mediated synthesis of acetaldehyde in rat brain. *Life Sci.* 37, 2077-2084.
- Aragón, C.M., Sternklar, G., Amit, Z., (1985b.) A correlation between voluntary ethanol consumption and brain catalase activity in the rat. *Alcohol* 2, 353- 356.
- Aragón, C.M., Abitbol, M., Amit, Z. (1986). Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. An examination using a conditioned taste aversion paradigm. *Neuropharmacology* 25, 79-83.

- Aragón, C.M., Amit, Z. (1987). Genetic variation in ethanol sensitivity in C57BL/6 and DBA/2 mice: a further investigation of the differences in brain catalase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 492, 398–400.
- Aragón, C.M., Spivak, K., Amit, Z. (1989). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol induced open-field activity: evidence for brain catalase mediation of ethanol's effects. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 13, 104–108.
- Aragón, C.M., Abitbol, M., Amit, Z. (1991a). Ethanol-induced CTA mediated by acetaldehyde through central catecholamine activity. *Psychopharmacology* 103, 74–77.
- Aragón, C.M.G., Rogan, F., Amit, Z., (1991b). Dose- and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. *Biochem. Pharmacol.* 42, 699–702.
- Aragón, C.M., Spivak, K., Amit, Z. (1991b). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39, 55–59.
- Aragón, C.M.G., Stotland, L.M., Amit, Z., (1991c). Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15, 165–169.
- Aragon, C.M., Rogan, F., Amit, Z. (1992a). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem. Pharmacol.* 44, 93–98.
- Aragón, C.M., Amit, Z. (1992b). The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action. *Neuropharmacology* 31, 709–712.
- Aragón, C.M., Rogan, F., Amit, Z. (1992). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem. Pharmacol.* 44, 93–98.
- Aragón, C.M., Amit, Z. (1993). Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 547–554.
- Arizzi-LaFrance, M.N., Correa, M., Betz A.J., Wisniecki A., Salamone, J.D. (2003). Behavioral stimulant effects of intracranial injections of ethanol, acetaldehyde and acetate in rats: studies with low and high rate operant schedules. *Behav Brain Res.* 147(1-2):203-10.
- Arizzi-LaFrance, M. N., Correa, M., Aragon, C. M. G., & Salamone, J. D. (2006). Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology*: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 31(5), 997–1008.
- Arnold, G y Holtzman, E. (1978). Microperoxisomes in the ethanol nervous system of the postnatal rat. *Brain Research* 155:1-17.
- Arolfo, M. P., Overstreet, D. H., Yao, L., Fan, P., Lawrence, A. J., Tao, G., Diamond, I. (2009). Suppression of heavy drinking and alcohol seeking by a selective ALDH-2 inhibitor. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(11), 1935–44.
- Asberg, A. y Tottmar, O. (1992). Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture fetal rat brain cells. *Developmental Brain Research* 66: 55-58.
- Aykin-Burns, N., Laegeler, A., Kellogg, G., Ercal, N. (2003). "Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats". *Arch Environ Cont. Toxicol.* , 44(3): 417-20.

- Ates, S. Cayli, E. Altinoz, I. Gurses, N. Yucel, M. Sener, A. Kocak, Yologlu S. (2007) Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats, *Mol. Cell Biochem.* 294 137–144.
- Badiani, A., Belin, D., Epstein, D., Calu, D., & Shaham, Y. (2011). Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nat. Rev. Neuroscience*, 12: 685-700.
- Balajthy Zoltán, Aradi János, Csősz Éva, Scholtz Beáta, István Szatmári, Tőzsér József, Varga Tamás (2011). *Molecular therapies book*.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Storey, E., Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *J. Neuroscience*, 3 (10): 481-92.
- Beal, M. F., Brouillet, E., Conde, F. O., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol.* 59(5):427-68.
- Bechara, E.J.H. (1996). Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 841–851.
- Becker, H. C. (2012). Animal Models of Excessive Alcohol Consumption in Rodents. *Alcohol dependence*
- Bellinger, D. C., & Bellinger, A. M. (2006). Science and society Childhood lead poisoning: the torturous path from science to policy, 116(4), 853–857.
- Benzi G, Pastoris O, Marzatico F, Villa RF. (1989) Age-related effect induced by oxidative stress on the cerebral glutathione system. *Neurochem Res* 14:473–481
- Berglund M., Lind B. Sorensen S., Vahter M. (2000). Impact of soil and dust lead on children's blood lead in contaminated areas of Sweden. *Archives of Environment Health.* 55 2:93-97.
- Berkaloff A, Bourguet J, Favard P, Lacroix J. (1988). *Biología y fisiología celular: Cloroplastos, peroxisomas, división celular*. Ed. Omega. Barcelona.
- Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315–331.
- Biihler.R., Pestalozzi.D. Hess., M. y von Wartburg.J.-P. (1983). Immunohistochemical localization of alcohol dehydrogenase in human kidney, endocrine organs and brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 18 (Suppl. 1). 55-59.
- Binienda, Z. and Kim, C.S. (1997). Increase in levels of total free fatty acids in rat brain regions following 3-nitropropionic acid administration, *Neurosci. Lett.*, 230 199–201.
- Binienda Z. K. and Ali S. F. (2001) Neuroprotective role of L-carnitine in the 3 nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 125, 67–73.
- Binienda, Z., Simmons, C., Hussain, S., Jr, W. S., & Ali, S. F. (1998). Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain, 251, 173–176.
- Booze, R.M., Mactutus, C.F. (1990). Developmental exposure to organic lead causes permanent hippocampal damage in Fischer rats. *Experientia* 46:292-297.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brannan T.S., Maker HS, Raes I.P. (1981). Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *J Neurochem* 36: 307–309.

- Brien, J. F.; Peachey, J. E; Rogers, B. J. y Loomis, C. W. (1978). A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 14: 133-141.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *68(5):815-34*.
- Brown, Z.W., Amit, Z., Smith, B. (1979). Intraventricular self-administration of acetaldehyde but not ethanol, in naïve laboratory rats. *Psychopharmacology* 64, 271–276.
- Burattini C, Gill T.M., Aicardi G, Janak P.H. (2006). The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. *Neuroscience* 139:877–887.
- Burkey, R.T.; Nation, J.R. (1994) Brain stimulation reward following chronic lead exposure in rats. *Behav. Neurosci.* 108:532-536.
- Cacace, S., Plescia, F., Barberi, I., & Cannizzaro, C. (2012). Acetaldehyde oral self-administration: evidence from the operant-conflict paradigm. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 36(7), 1278–87.
- Cannon D.S., Carrell L.E. (1987). Rat strain differences in ethanol self-administration and taste aversion learning. *Pharmacol Biochem Behav.* 1:57-63.
- Canfield, R.L., Henderson, C.R. Jr., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A. and Lanphear, B.P. (2003a). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1517–1526.
- Cardon A.L., Rocha A., Valles R., Bratton G.R., Nation J.R. (2004) Exposure to cadmium during gestation and lactation decreases cocaine self-administration in rats. *Neurotoxicology* 25, 869–75.
- Carlezon W.A. Jr, Wise R.A. (1996). Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *J Neurosci.*1; 16(9):3112-22.
- Chao HM (1995) Alcohol and the mystique of flushing. *Alcohol ClinExp Res* 19(1):104-109.
- Chen, Y.; Yu, A; Saari, J .T; Kang J.(1997). Repression of hipoxia-reoxygenation injury in the catalase-overexpressing heart of transgenic mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216:112-116.
- Chiaradia M., Chenhall B.E. , Depers A.M., Gulson B.L., Jones B.G. (1997). Identification of historical lead sources in roof dusts and recent lake sediments from an industrialized area: indications from lead isotopes. *Science of The Total Environment.* 205: 2–3.
- Ciriolo M.R., Marasco M.R., Iannone M., Nistico G., Rotilio G. (1997). Decrease of immunoreactive catalase protein in specific areas of ageing rat brain. *Neurosci Lett* 228:21–24.
- Cohen, G., Sinet, P.M., Heikkila, R.E. (1980). Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4, 366–370.
- Colombo, G., Agabio, R., Lobina, C., Reali, R., Vacca, G., & Luigi, G. (1998). Stimulation of locomotor activity by voluntarily consumed ethanol in Sardinian alcohol-preferring rats, 109–113.
- Cooper Z.D., Shi Y.G., Woods J.H. (2010). Reinforcer-dependent enhancement of operant responding in opioid-withdrawn rats. *Psychopharmacology* 212:369–378.
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., Aragon, C.M. (1999a). Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol* 19, 43–49.
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., Aragon, C.M. (1999b). Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: the role of brain catalase. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 799–805.

- Correa M., Miquel M., Sanchis-Segura C., Aragon C.M. (1999). Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: the role of brain catalase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 799–805.
- Correa, M., Miquel, M., Aragon, C.M. (2000). Lead acetate potentiates brain catalase activity and enhances ethanol-induced locomotion in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 137–142.
- Correa, M., Sanchis-Segura, C., Aragon, C.M. (2001). Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug Alcohol Depend.* 65, 9–15.
- Correa, M., Arizzi, M. N., Betz, a., Mingote, S., & Salamone, J. D. (2003). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Research Bulletin*, 62(3), 197–202.
- Correa, M., Chuck, T., Arizzi, M.N., Betz, A., McLaughlin, P.J., Salamone, J.D. (2003a). Motor effects of ethanol and ethanol metabolites after intracranial or peripheral injections in rats. *Behav. Pharmacol.* 14, 76–77.
- Correa, M., Arizzi, M.N., Betz, A.J., Mingote, S., Salamone, J.D. (2003b). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res. Bull.* 62, 197–202.
- Correa, M., Arizzi, M.N., Betz, A.J., Mingote, S., Salamone, J.D. (2003c). Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology* 170, 368–375.
- Correa, M., Mingote, S., Betz, A., Wisniecki, A., Salamone, J.D. (2003d). Substantia nigra pars reticulata GABA is involved in the regulation of operant lever pressing: pharmacological and microdialysis studies. *Neuroscience* 119, 759–766.
- Correa, M., Sanchis-Segura, C., Pastor, R., Aragon, C.M. (2004). Ethanol intake and motor sensitization: the role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiol. Behav.* 82, 231–240.
- Correa, M., Salamone, J.D., Aragon, C.M. (2005a). Central and peripheral effects of ethanol and acetaldehyde on measures of anxiety in rats. *Behav. Pharmacol.* 16,19.
- Correa, M., Manrique, H.M., Font, L., Escrig, M.A., Aragon, C.M. (2008). Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed acetaldehyde: the role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents. *Psychopharmacology* 200, 455–464.
- Correa, M., Manrique, H. M., Font, L., Escrig, M. a, & Aragon, C. M. G. (2008). Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed acetaldehyde: the role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents. *Psychopharmacology*, 200(4), 455–64.
- Correa, M., Viaggi, C., Escrig, M.A., Pascual, M., Guerri, C., Vaglini, F., Aragon, C.M., Corsini, G.U., (2009a). Ethanol intake and ethanol-induced locomotion and locomotor sensitization in CYP2e1 knockout mice. *Pharmacogenet. Genomics* 19, 217–225.
- Correa, M., Arizzi-LaFrance, M.N., Salamone, J.D. (2009b). Infusions of acetaldehyde into the arcuate nucleus of the hypothalamus induce motor activity in rats. *Life Sci.* 84, 321–327.
- Correa, M., Salamone, J. D., Segovia, K. N., Pardo, M., Longoni, R., Spina, L., Acquas, E. (2012). Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(1), 40–30.

- 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. *Environ. Health Perspect.* 112, 717–30.
- Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc* 63:49–63.
- Critchler, E. C. y Myers, R. D. (1987). Cyanamide given ICV or systemically to the rats alters subsequent alcohol drinking. *Alcohol* 4:347-353.
- Crow LT. (1970). Alcohol state transfer effects with performance maintained by intracranial self-stimulation. *Physiol Behav.*5(4):515-7.
- Cunningham, C. L. (1993). Pavlovian drug conditioning. In F. Haaren (Ed.), *Methods in behavioral pharmacology*. Amsterdam: Elsevier
- Cunningham, C. L., Ph, D., Fidler, T. L., Ph, D., Hill, K. G., & Ph, D. (2000). Animal Models of Alcohol 's Motivational Effects, 24(2), 85–92.
- Czachowski, C. L., Samson, H. H., & Denning, C. E. (1999). Blood Ethanol Concentrations in Rats Drinking Sucrose / Ethanol Solutions, 23(8), 1331–1335.
- Davis WM, Werner TE, Smith SG. (1979) Reinforcement with intragastric infusions of ethanol: blocking effect of FLA 57. *Pharmacol Biochem Behav.* 11(5):545-8.
- Deitrich, R. A. (1966). Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochemical Pharmacology.* 15: 1911-1922.
- Deitrich, R. A.; Collins, A. C. y Erwin, V. G. (1972). Genetic influence upon phenobarbital- induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of Biological Chemistry.* 247:7232-7236.
- Deitrich, R.A.; Troxell, P.A.; Worth, W.S. y Erwin, V.G. (1976). Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochemical Pharmacology.* 52: 2733-2737.
- DeMaster, E. G.; Shirota F. N. y Nagasawa, H. T. (1984). The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 122:1. 358-365.
- DeMaster, E. G.; Shirota F. N. y Nagasawa, H. T. (1984). Catalase mediated conversión of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol.* 2: 117-121.
- DeMaster, E. G.; Redfern B.; Shirota F. N. y Nagasawa, H. T. (1986). Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochemical Pharmacology.* 35: 13.2081-2085.
- DeMaster, E. G.; Shirota F. N. y Nagasawa, H. T. (1988). Oxidation of cyanamide by a cumene hydroperoxide-supported catalase reaction yiel disulfiran cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Archives.* 4: 203–207.
- DeMaster, E. G.; Stevens, J. M. y Redfern, B. (1988). Ethanol oxidation by cumene hydroperoxide and hydrogen peroxide-supported peroxidatic activities of catalase. *Biochemical Archives.* 4: 319-327.
- Depoortere R.Y., Li DH, Lane J.D., Emmett-Oglesby M.W. (1993). Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 45:539-548.

- Diana, M., Peana, A. T., Sirca, D., Lintas, A., Melis, M., & Enrico, P. (2008). Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139, 307–17.
- Ding Z.M., Ingraham C.M., Rodd Z.A., McBride W.J.(2014). The reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area depend on dopamine neurotransmission to forebrain cortico-limbic systems. *Addict Biol*.
- 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. *Arch Argent Pediatr* 107, 300–306.
- Dringen, R., Pawloski, P., Hirrlinger, J. (2005). “Peroxide detoxification by brain cells”. *Journal of Neurosciencie Research*, 79:157-165.
- Eglitis MA, Kantoff P, Gilboa E, Anderson WF. (1985) Gene expression in mice after high efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science*. 4732:1395-8.
- Ensminger M.E., Anthony J.C., McCord J. (1997). The inner city and drug use: initial findings from an epidemiological study. *Drug Alcohol Depend* 48:175– 84.
- Escarabajal, D., Miquel, M., Aragon, C.M.G. (2000). A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol-induced locomotor activity in mice. *J. Stud. Alcohol* 61,493–498.
- Escarabajal, M. D., & Aragon, C. M. G. (2002). The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice, 72, 389–395.
- Escarabajal, M. D. (2003). Alteraciones genéticas relacionadas con el alcoholismo. *Rev aneurol* 37 (5): 471-480.
- Escorihuela R. y Fernández-Teruel A. (1998). Modelos animales en psicopatología y psicofarmacología: del análisis experimental de la conducta a la neurogenética. *Psicología Conductual*, 6: 165-191.
- Esparza M.A., Bollati F., Garcia-Keller C., Virgolini M.B., Lopez L.M., Brusco A., Shen H.W., Kalivas P.W., Cancela L.M. (2012). Stress-induced sensitization to cocaine: actin cytoskeleton remodeling within mesocorticolimbic nuclei. *Eur J Neurosci*. 36(8):3103-17.
- Fahlke C., Engel J.A., Eriksson, C.J., Hård, E., Söderpalm, B., (1994a). Involvement of corticosterone in the modulation of ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 11, 195–202.
- Fahlke C., Thomasson R., Hård E., Engel J.A., Hansen S. (1994b) Taste reactivity to ethanol in rats: influence of adrenalectomy or ipsapirone. *Alcohol* 11, 289–94.
- Fahlke C., Eriksson C.J. (2000) Effect of adrenalectomy and exposure to corticosterone on alcohol intake in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Alcohol* 35, 139–44.
- Finkelstein, Y., Markowitz, M. E., & Rosen, J. F. (1998). Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects, 168–176.
- Font, L., Miquel, M., Aragon, C.M. (2005). Prevention of ethanol induced behavioral stimulation by d-penicillamine: a sequestration agent for acetaldehyde. *Alcohol.Clin. Exp. Res.* 29, 1156–1164.
- Font, L., Aragon, C.M., Miquel, M. (2006). Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behav. Brain Res.* 171, 78–86.
- Font, L., Aragon, C. M. G., & Miquel, M. (2006). Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behavioural Brain Research*, 171(1), 78–86.

- Font, L., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2008). Involvement of brain catalase activity in the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference. *Physiology & Behavior*, 93(4-5), 733–41.
- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47–58.
- Ford, C.P., Mark, G.P., Williams, J.T. (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J. Neurosci.* 26, 2788–2797.
- Forum CDC Updates Guidelines for Children’s Lead Exposure, 2012.
- Fricker B., Muller A., René F. (2008). Evaluation tools and animal models of peripheral neuropathies, *Neurodegenerative Dis.* 5 72–108.
- Gallicchio L., Scherer R.W., Sexton M. (2002) Influence of nutrient intake on blood lead levels of young children at risk for lead poisoning. *Environ. Health Perspect.* 110, A767–72.
- Garver, E., Ross, A. D., Tu, G., Cao, Q., Zhou, F., & Israel, Y. (2000). Paradigm to test a drug-induced aversion to ethanol, 35(5), 435–438.
- Garver, E., Tu, G.C., Cao, Q.N., Aini, M., Zhou, F., Israel, Y. (2001). Eliciting the low activity aldehyde dehydrogenase Asian phenotype by an antisense mechanism results in an aversion to ethanol. *J. Exp. Med.* 194, 571–580.
- Gardner E.L. (2002) Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem Phys Lipids* 121:267–290.
- Gatto GJ1, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK. (1994). Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol.* 6:557-64.
- Gaunt. G. L. and de Duve. C. (1976) Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 26, 749-759.
- Gaval-cruz, M., & Weinshenker, D. (2009). Meriem Gaval-Cruz and David Weinshenker, 9(4), 175–187.
- Gill, K., Menez, J.F., Lucas, D., Deitrich, R.A. (1992). Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol* 16, 910–915.
- Gill, K., Liu, Y., Deitrich, R.A. (1996). Voluntary alcohol consumption in BXD recombinant inbred mice: relationship to alcohol metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 185–190.
- Gilpin, N.W.; Richardson, H.N.; Lumeng, L.; and Koob, G.F. (2008a.) Dependence-induced alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats and outbred Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(9):1688–1696.
- Grant KA, Samson HH (1985). Oral self administration of ethanol in free feeding rats.. *Alcohol.* 2(2):317-21.
- Grant KA, Samson H.H. (1986) The induction of oral ethanol self-administration by contingent ethanol delivery. *Drug Alcohol Depend.* 16(4):361-8.
- Grant KA, Lovinger D.M (1995). Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes. *Clin Neurosci* 3: 155–164.
- Green, A. S., & Grahame, N. J. (2008). Ethanol drinking in rodents: is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 42(1), 1–11.



- Greenfield, N. J y Pietruszko R. (1977). Two aldehyde dehydrogenases from human liver: Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochemical and Biophysical Acta.* 483: 35-45.
- Grover C.A., Nation J.R., Bratton G.R. (1993) Chronic exposure to lead attenuates cocaine-induced behavioral activation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 221-5.
- Guilarte T.R., Toscano C.D., McGlothlan J.L., Weaver S.A. (2003). Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Ann Neurol* 53: 50-56.
- Gulson B.j, Jameson C. Mahaffey, Mizon K., Korsch M. and Vimpani G. (1997). Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *Journal laboratory clinical medicina* 130:51-62.
- Gulson, B.L., Mizon, K.J., Korsch, M.J., Palmer, J.M. and Donnelly, J.B. (2003). Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation a summary of long-term research. *Sci. Total Environ.*, 303(1-2): 79-10.
- Gurger, H. Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol Med.* 29(10): 927-45.
- Haider S., Saleem S., Tabassum S., Khaliq S., Shamim S., Batool Z., Parveen T., Inam Q., Haleem D.J. (2013) Alteration in plasma corticosterone levels following long term oral administration of lead produces depression like symptoms in rats. *Metab. Brain Dis.* 28, 85-92.
- Hamby-Mason, R; Chen, J. J.; Schenker, S., Perez, A. y Henderson, G.I. (1997). Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21:6. 1063-1072.
- Hansen C., Buteler R., Procopovich E., Pagan G, Blas Diaz, Gait N., Virgolini M., Mezzano M., Britos S., Fulginiti S. (1999). Niveles de plomo en sangre en niños de la ciudad de Córdoba. *Medicina* 59: 167-170.
- Hansson T., Tinberg. N., Ingelman-Sundberg. M and Kohler. C. (1990). Regional distribution of ethanolinducible cytochrome P 450 IIEI in the rat central nervous system. *Neuroscience* 34, 451-463.
- Hashimoto. T., Ueha. T., Kuriyama. T., Katsura. M. and Kuriyama. K (1989). Acetaldehyde-induced alterations in metabolism of monoamines in mouse brain. *Alcohol and Alcoholism* 24, 91-99.
- Heap L, Ward RJ, Abiaka C, Dexter D, Lawlor M, Pratt O, Thomson A, Shaw K, Peters TJ (1995) The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem Pharmacol* 50:263-270.
- Hecht G.S., Spear N.E., Spear L.P. (1998). Alterations in the reinforcing efficacy of cocaine in adult rats following prenatal exposure to cocaine. *Behav Neurosci* 112:410-418.
- Heilig, M., & Koob, G. F. (2007). A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends in Neurosciences* 30(8), 399-406.
- Heim, W.G; Appleman, D y Pyfrom, H.T. (1955). Production of catalase changes in animal with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science.* 122: 693-694.
- Hermes-Lima M., Pereira B., Bechara E.J.H. (1991). Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica.* 21(8):1085-1090.
- Heyman, G. M. (1993). Ethanol regulated preference in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 259-269.

- Higgins, S.T.; Budney, A.J.; Bickel, W.L.; Foe rg, F.E.; Donham, R.; and Badger, G.J (1994). Incentives improved outcome in outpatient behavioral treatment of cocaine dependence. *Archives of General Psychiatry* 51:568–576.
- Hipólito, L., Sánchez, M.J., Polache, A., Granero, L. (2007). Brain metabolism of etanol and alcoholism: an update. *Curr. Drug Metabol.* 8, 716–727.
- Hodos W. (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134:943-944.
- Hodge C.W., Haraguchi M, Erickson H, Samson H.H. (1993). Ventral tegmental microinjections of quinpirole decrease ethanol and sucrose-reinforced responding.. *Alcohol Clin Exp Res.*17 (2):370-5.
- Houdou S, Kuruta H, Hasegawa M, Konomi H, Takashima S, Suzuki Y, Hashimoto T (1991) Developmental immunohistochemistry of catalase in the human brain. *Brain Res* 556:267–270.
- Huang Q, Yeldandi A.V., Alvares K, Ide H, Reddy J.K., Rao M.S. (1995). Localization of peroxisome proliferator-activated receptor in mouse and rat tissues and demonstration of its nuclear translocation in transfected CV-1 cells. *Int J Oncol* 6:307–31
- Hungund, B.L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B.S., Vadasz, C. (2003). Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 84, 698e704.
- Hussain S, Silkker J.R y Ali S. F. (1995). Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int. J. Devl Neuroscience.*138:811-817.
- Ikemoto, S. (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens–olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews* 56, 27–78.
- Ikemoto S., Bonci A. (2014). Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology.*76:329-41.
- Inoue, K. y Lindros, K.O. (1982). Subcellular distribution of human brain aldehyde dehydrogenase. *Journal of neurochemistry.* 38: 4.884-888.
- Isse, T., Oyama, T., & Matsuno, K. (2005). Aldehyde dehydrogenase 2 activity affects symptoms produced by an intraperitoneal acetaldehyde injection, but not acetaldehyde lethality, 30(4), 315–328.
- Ishii, H; Suga, T y Niinobe, S. (1977). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on lipid metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology.* 25:1438-1440.
- Jamal, M., Ameno, K., Kubota, T., Ameno, S., Zhang, X. I. A., Kumihashi, M., & Ijiri, I. (2003). In vivo formation of salsolinol induced by high acetaldehyde concentration in rat striatum employing microdialysis, 38(3), 197–201.
- 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, 1245–1248.
- Kaul B. (1999). Lead exposure and Iron deficiency amon Jammu and New Delhi children. *Indian journal of pediatrics.* 66:27-35.
- Karahanian, E., Quintanilla, M. E., Tampier, L., Rivera-Meza, M., Bustamante, D., Gonzalez-Lira, V., Israel, Y. (2011). Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research,* 35(4), 606–12.

- Karahanian, E., Rivera-meza, M., Tampier, L., Quintanilla, M. E., Herrera-marschitz, M., & Israel, Y. (2014). 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, 336–344.
- Katner SN, McBride WJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM. (1997). Alcohol intake of P rats is regulated by muscarinic receptors in the pedunculopontine nucleus and VTA. *Pharmacol Biochem Behav* 58(2):497-504.
- Keilin, D. & Hartree, E. F. (1945) *Biochem. J.* 39,293-301.
- Kera, Y., Kiriya, T., Komura, S. (1985). Conjugation of acetaldehyde with cysteinylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by gamma-glutamyltranspeptidase. *Agents Actions* 17, 48–52.
- Kerr. J.T., Maxwell. D.S., and Crabb. D. W. (1989) Immunocytochemistry of alcohol dehydrogenase in rat central nervous system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 13, 730-736.
- Kitagawa R, Miyachi S, Hanawa H, Takada M, Shimada T. (2007) *Neurosci Res.* 4:550-8.
- Klaassen, C.: Casarett and Doull's Toxicology. "The Basic Science of Poisons". Mac Graw-Hill. 7<sup>th</sup> Edition.
- Koechling, U.M., Amit, Z. (1992). Relationship between blood catalase activity and drinking history in a human population, a possible biological marker of the affinity to consume alcohol. *Alcohol* 27, 181–188.
- Koechling, U.M., Amit, Z., Negrete, J.C. (1995). Family history of alcoholism and the mediation of alcohol intake by catalase: further evidence for catalase as a marker of the propensity to ingest alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19, 1096–1104.
- Koivula, T; Turner, A.J.; Huttunen, M. y Koivusalo, M. (1981). Subcellular and perisynaptic distribution of rat brain aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of Neurochemistry.* 36: 1893-1897.
- Koob G.F., Bloom F.E. (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Review. Science.* 4; 242(4879):715-23.
- Koob G.F. (2004) A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem Pharmacol* 68:1515–1525.
- Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, O'Dell LE, Parsons LH, Sanna P.P. (2004) Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 27:739–749.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., & Petersen, D. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application, 64(3), 520–539.
- Lankford MF, Roscoe AK, Pennington SN, Myers RD. (1991). Drinking of high concentrations of ethanol versus palatable fluids in alcohol-preferring (P) rats: valid animal model of alcoholism. *Alcohol.* 4:293-9.
- Little, H.J. (1991). Mechanism that may underlie the behavioral effects of ethanol. *Prog. Neurobiol.* 36:171-194.

- Liu, J., Goyer, R.A. and Waalkes, M.P. (2008). "Toxic Effects of Metals" en: Klaassen, C.: Casarett and Doull's Toxicology. "The Basic Science of Poisons". Mac Graw-Hill. 7<sup>th</sup> Edition.
- Llallemand, F; Kest, W; Ward, R. J y De Witte (1999) Ethanol metabolism in acatalasemic rats. *Alcohol and Alcoholism* 34: 3. 346.
- Loomis, C. W., Brien, J. F. (1983a). Specificity of hepatic aldehyde dehydrogenase inhibition by calcium carbimide (calcium cyanamide) in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61. 9. 1025-1034.
- Loomis, C. W., Brien, J. F. (1983b). Specificity of hepatic aldehyde dehydrogenase inhibition by calcium carbimide (calcium cyanamide) in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61:4, 431-435
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. (1991). 3- Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neural Sci* 18:492-498.
- Ludolph AC, Seelig MO, Ludolph A, Novitt P, Allen Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V., & Santamaría, A. (2010). 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(2), 878–916.
- Lui S, Jones R.L., Robinson N.J., Greenwood S.L., Aplin J.D., Tower C.L. (2014). Detrimental effects of ethanol and its metabolite acetaldehyde, on first trimester human placental cell turnover and function. *PLoS One* 2: 4-9.
- McKenna O, Arnold G, Holtzman E. (1976). Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Res* 117: 181–194.
- Mahaffey, K.R; Goyer, R.A; Wilson, M.H. (1974). Influence of ethanol ingestion on lead toxicity in rats fed isocaloric diets. *Arch. Environ. Health*, 28:217-222.
- Manrique, H. M., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2006). Acute administration of 3-nitropropionic acid, a reactive oxygen species generator, boosts ethanol-induced locomotor stimulation. New support for the role of brain catalase in the behavioural effects of ethanol. *Neuropharmacology*, 51(7-8), 1137–45.
- Manzardo A.M., Stein L, Belluzzi J.D. (2002). Rats prefer cocaine over nicotine in a two-lever self-administration choice test. *Brain Res* 924:10–19.
- Marchitti, S. A., Deitrich, R. A., & Vasiliou, V. (2007). Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine-Derived 3, 4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and The Role of Aldehyde Dehydrogenase, 59(2), 125–150.
- Margoliash, E; Novogrodsky, A y Schejter; A. (1960). Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochemical Journal* 74:339-350.
- Martínez SE, Vaglenova J, Sabrià J, Martínez MC, Farrés J, Parés X. (2001). Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268(19):5045–5056.
- Martinez S.A, Simonella L. , Hansen C., Rivolta S., Cancela L.M., Virgolini M.B. (2013) Blood lead levels enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Cordoba, Argentina, after the band of leaded gasolina. *Hum Exp Toxicol* 32:449-463.

- Marti-Prats L, Sanchez-Catalan MJ, Hipolito L, Orrico A, Zornoza T, Polache A, Granero L. (2010). Systemic administration of D-penicillamine prevents the locomotor activation after intra- VTA ethanol administration in rats. *Neurosci Lett* 483: 143–147.
- Marti-Prats L, Sanchez-Catalan MJ, Orrico A, Zornoza T, Polache A, Granero L. (2013). Opposite motor responses elicited by ethanol in the posterior VTA: the role of acetaldehyde and the nonmetabolized fraction of ethanol. *Neuropharmacology* 72: 204–214.
- Mayorga A.J., Trevitt J.T., Conlan A, Gianutsos G, Salamone J.D. (1999). Striatal and nigral mechanisms involved in the antiparkinsonian effects of SKF 82958 (APB): studies of tremulous jaw movements in rats. *Psychopharmacology* 143:72–81.
- Mason B.J., Shaham Y, Weiss F, Le A.D. (2009). Stress, alcohol craving, and relapse risk: mechanisms and viable treatment targets. *Alcohol*. 7:541-3.
- Mcbride, W. J., Li, T., Deitrich, R. A., Zimatkin, S., Smith, B. R., & Rodd-henricks, Z. A. (2002). Involvement of Acetaldehyde in Alcohol Addiction, 26(1), 114–119.
- Mcbride, W. J, Bell R.L., Rodd Z.A., Strother W.N., Murphy J.M. (2005). Adolescent alcohol drinking and its long-range consequences. Studies with animal models. *Recent Dev Alcohol*;17:123-42.
- Meisch R, Thompson T. (1973). Ethanol as a reinforcer: Effects of fixed ratio and food deprivation. *Psychopharmacologia* 28:71–183.
- Melis M, Enrico P, Peana A.T., Diana M. (2007). Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci* 26:2824–2833.
- Melis M, Carboni E, Caboni P, Acquas E. (2013). Key role of salsolinol in ethanol actions on dopamine neuronal activity of the posterior ventral tegmental area. *Addict Biol*.
- Miller E.N., Selnes O.A. (1993). Aviation safety and asymptomatic HIV-1 infection. *Aviat Space Environ Med* 11:1059-60.
- Miller D.K, Nation J.R., Bratton G.R. (2000a). Perinatal exposure to lead attenuates the conditioned reinforcing properties of cocaine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 111–119.
- Miller D.K., Nation J.R., Jost T.E., Schell J.B., Bratton G.R. (2000b). Differential effects of adult and perinatal lead exposure on morphine-induced locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67, 281–90.
- Misra U.K, Bradford BU, Handler JA, Thurman RG. (1992). “Chronic ethanol treatment induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production selectively in pericentral regions of the liver lobule”. *Alcohol Clin Exp Res.* 16(5):839-42.
- Moline J., Lopez C. L., Torres S. L., Gdbold J., Todd A. (2000). Lactation and lead body burden turnover: A pilot study in Mexico. *Journal Occupational Environment Medicine* 42:11,1070-1075.
- Montoliu, C., Valls, S., Renau-piqueras, J., & Guerri, C. (1994). Ethanol-Induced Oxygen Radical Formation and Lipid Peroxidation in Rat Brain: Effect of Chronic Alcohol Consumption.
- Moreno S, Mugnaini E, Ceru M.P. (1995). Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 43: 1253–1267.

- Motavkin. P.A., Okhotin. V.E., Konovko. O. O. and Zimatkin. S. M. (1990) Localization of aldehyde- and alcohol dehydrogenase in the human spinal cord and brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 20, 79-84.
- Myers WD, Ng KT, Singer G. (1982). Intravenous selfadministration of acetaldehyde in the rat as a function of schedule, food deprivation and photoperiod. *Pharmacol Biochem Behav* 17:807-811.
- Nagasawa, H.T., Elberling, J.A., DeMaster, E.G. (1980). Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde. *Journal of Medicinal Chemistry* 23, 140e143.
- Nation J.R., Baker D.M., Taylor B., Clark D.E. (1986) Dietary lead increases ethanol consumption in the rat. *Behav. Neurosci.* 100, 525-30.
- Nation, J.R; Dugger, L.M; Dwyer, K.K; Bratton, G.R; Grover, C.A (1991a). The effects of dietary lead on ethanol-reinforced responding. *Alcohol Alcohol* 26:473-480.
- Nation, J.R; Grover, C.A y Bratton, G.R. (1991b). Lead attenuates the antipunishment effects of ethanol. *Alcohol* 8:1-5.
- Nation J.R., Livermore C.L., Burkey R.T. (1996) Chronic lead exposure attenuates sensitization to the locomotor-stimulating effects of cocaine. *Drug Alcohol Depend.* 41, 143-149.
- Nation J.R., Miller D.K., Bratton G.R. (2000) Developmental lead exposure alters the stimulatory properties of cocaine at PND 30 and PND 90 in the rat. *Neuropsychopharmacology* 23, 444-54.
- 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, 236-43.
- 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. *Neurotoxicol Teratol.* 6: 711-713.
- Nelson, G. H.; Kinard, F. W.; Aull, J. C. y Hay, B. S. (1956). Effect of aminotriazole on alcohol metabolism and hepatic enzyme activities in several species. *Journal of Studies on Alcohol.* 18: 343-348.
- Nestler E.J.; Carlezon W.A. Jr. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 59(12):1151-9.
- Nevin, R. (2000). How Lead Exposure Relates to Temporal Changes in IQ, Violent Crime, and Unwed Pregnancy, *83(1)*, 1-22.
- Novikoff A.B., Novikoff P.M. (1982). Microperoxisomes and peroxisomes in relation to lipid metabolism. *Ann NY Acad Sci* 386:138-150
- Numan, R. (1981). Multiple exposures to ethanol facilitate intravenous selfadministration of ethanol by rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 15, 101e108.
- Oberto, A., Marks, N., Evans, H.L., Guidotti, A. (1996). Lead (Pb + 2) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 435-442.
- Ocaranza, P., Quintanilla, M.E., Tampier, L., Karahanian, E., Sapag, A., Israel, Y. 2008. Gene therapy reduces ethanol intake in an animal model of alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32, 52-57.
- Orrico A, Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Marti-Prats L, Zornoza T, Granero L, Polache A. (2013). Efficacy of D-penicillamine, a sequestering acetaldehyde agent, in the prevention of alcohol relapse-like drinking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 228:563-575

- Orsolya E., Axel Varga, Hansen K., Sandøe Peter and Olsson I. Anna S. (2010). Validating Animal Models for Preclinical Research: A Scientific and Ethical Discussion. *Altern. Lab. Anim.* 38:245–248.
- Pang, Z., Geddes, J. W. (1997). Mechanisms of Cell Death Induced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid: Acute Excitotoxic Necrosis and Delayed Apoptosis, *17(9)*, 3064–3073.
- Papas AM (1999).Diet and antioxidant status. *Food Chem Toxicol.* (9-10):999-1007.
- Pastor R, Sanchis-Segura C, Aragon C.M.G (2002). Ethanol stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rate of production. *Psychopharmacology* 165: 51–59.
- Pastor, R., Aragon, C.M. (2008). Ethanol injected into the hypothalamic arcuatenucleus induces behavioral stimulation in rats: an effect prevented by catalase inhibition and naltrexone. *Behav. Pharmacol.* 19, 698–705.
- Pastor, R., McKinnon, C. S., Scibelli, A. C., Burkhart-Kasch, S., Reed, C., Ryabinin, A. E. (2008). Corticotropin-releasing factor-1 receptor involvement in behavioralneuroadaptation to ethanol: a urocortin1-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105,9070e9075.
- Patrick, L. (2006). Lead Toxicity, A Review of the Literature. Part I: Exposure, Evaluation, and Treatment, *11(1)*.
- 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*, *11(2)*: 114-127.
- Peana, A.T., Enrico, P., Assaretti, A.R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M.,Piga, A., Lintas, A., Diana, M., (2008). Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in the rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32, 249– 258.
- Peana, A. T., Muggironi, G., Calvisi, G., Enrico, P., Mereu, M., Nieddu, M., Diana, M. (2010). l-Cysteine reduces oral ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-drinking behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *94(3)*, 431–7.
- Peana, A. T., Muggironi, G., Fois, G. R., Zinellu, M., Sirca, D., & Diana, M. (2012). Effect of (L)-cysteine on acetaldehyde self-administration. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *46(5)*, 489–97.
- Peana, A. T., Porcheddu, V., Bennardini, F., Carta, A., Rosas, M., & Acquas, E. (2015). Role of ethanol-derived acetaldehyde in operant oral self-administration of ethanol in rats. *Psychopharmacology*, *232(23)*, 4269–76.
- Phillipson O.T. (1979a) A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 187:99–115.
- Phillipson O.T. (1979b) The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187:85–98.
- Phillipson O.T. (1979c) Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187:117–143.
- Phillipson O.T., Griffiths AC (1985) The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* 16:275–296.

- Piazza PV, Le Moal ML. (1996). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:359–78.
- Piazza, P. V., and Le Moal, M. (1998). The role of stress in drug selfadministration. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 67–74.
- Piazza, P. V., Moal, M. Le, Saint-sae, C. (2000). Vertical Shifts in Self-Administration Dose–Response Functions Predict a Drug-Vulnerable Phenotype Predisposed to Addiction, *20(11)*, 4226–4232.
- Pizent A, Jurasovic J., Telisman S. (2001) Blood pressure in relation to dietary calcium intake, alcohol consumption, blood lead, and blood cadmium in female nonsmokers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15, 123–30
- Pohorecky L.A. (1981) The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 5, 209–29.
- Prasad C., Prasad A. (1995) A relationship between increased voluntary alcohol preference and basal hypercorticoesteronemia associated with an attenuated rise in corticosterone output during stress. *Alcohol* 12, 59–63.
- Propping, P. (1977). Genetic control of ethanol action on the central nervous system: an EEG study in twins. *Human Genetics.* 35: 309-334.
- Quertemont, E., Grant, K. a., Correa, M., Arizzi, M. N., Salamone, J. D., Tambour, S., Diana, M. (2005). The Role of Acetaldehyde in the Central Effects of Ethanol. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 29(2), 221–234.
- Quertemont, E. (2004). Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Molecular Psychiatry*, 9(6), 570–81.
- Quertemont, E., Grant, K.A., Correa, M., Arizzi-LaFrance, M.N., Salamone, J.D., Tambour, S., Aragon, C.M., 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. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 221–234.
- Quertemont, E., Didone, V (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Res. Health.* 29 (4), 258–265.
- Quintanilla, M.E., Tampier, L; Mardones, J. (1980). Influence of 3-amino-1,2,4-triazole on paraldehyde and pentobarbital induced narcosis in rats. *ICRS Med. Sci.* 8:35.
- Quintanilla, M.E., Tampier, L., Sapag, A., Israel, Y. (2005). Polymorphisms in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (*Aldh2*) determine peak blood acetaldehyde levels and voluntary ethanol consumption in rats. *Pharmacogenet. Genomics* 15, 427–431.
- Quintanilla, M.E., Tampier, L., Sapag, A., Gerdtzen, Z., Israel, Y. (2007). Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversion to ethanol in the rat: a systems perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E531– E537.
- Rafaelés, L. S.; Bornschein, R.L; Michaelson, LA; Loch, R. K.; Barker, G.F. (1979). Drug induced activity in lead exposed mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 95-104.
- Rafales L.S., Greenland R.D., Zenick H., Goldsmith M., Michaelson I.A. (1981) Responsiveness to d-amphetamine in lead-exposed rats as measured by steady state levels of catecholamines and locomotor activity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 3, 363–7.



- Reddy B.V., Boyadjieva N, Sarkar D.K. (1995). Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on betaendorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of beta-endorphin release. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 339–344.
- Rice M.E., Patel J.C., Cragg S.J. (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112–137.
- Reitze, H. K. y Seitz, K. A. (1985). Light and electron microscopical changes in the liver of mice following treatment with aminotriazole. *Experimental Pathology*. 27:17-31.
- Rintala, J., Jaatinen, P., Lu, W., Sarviharju, M., Eriksson, C. J. P., Laippala, P., Kiianmaa, K. and Hervonen, A. (1997) Effects of lifelong ethanol consumption on cerebellar layer volumes in AA and ANA rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 21, 311–317.
- Rintala J, Jaatinen P, Parkkila S, Sarviharju M, Kiianmaa K, Hervonen A, Niemelä O (2000). Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* (5):458-63.
- Risinger FO, Brown MM, Doan AM, Oakes RA. (1998). Mouse strain differences in oral operant ethanol reinforcement under continuous access conditions. *Alcohol Clin Exp Res*. 3:677-84.
- Ritz MC, George FR, Meisch RA. (1989). Ethanol self-administration in ALKO rats: II. Effects of selection and fixed-ratio size. *Alcohol*. 6(3):235-9.
- Rivera-Meza, M., Quintanilla, M. E., Tampier, L., Mura, C. V, Sapag, A., & Israel, Y. (2010). Mechanism of protection against alcoholism by an alcohol dehydrogenase polymorphism: development of an animal model. *FASEB J*. (1):266-74.
- Roberts DCS J. (1997) A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine neural substrates of drug reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav* 57:441– 447.
- Roberts A.J., Gold L.H., Polis I, McDonald J.S., Filliol D, Kieffer B.L., Koob G.F. (2001). Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 9:1249–56.
- 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 *Neuropsychopharmacol*. 11, 2058–2064.
- Rodd-Henricks, Z.A., Melendez, R.I., Zaffaroni, A., Goldstein, A., McBride, W.J., Li, T.K. (2002). The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 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. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 27, 440–449.
- Rodd, Z. a., Bell, R. L., McKinzie, D. L., Webster, a. a., Murphy, J. M., Lumeng, L., McBride, W. J. (2004). Low-Dose Stimulatory Effects of Ethanol During Adolescence in Rat Lines Selectively Bred for High Alcohol Intake. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 28(4), 535–543.
- Rodd, Z.A., Bell, R.L., Zhang, Y., Murphy, J.M., Goldstein, A., Zaffaroni, A., Li, T.K., McBride,

- W.J. (2005). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* 30, 330–338.
- 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. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 32, 230–239.
- Roels F, Cornelis A. (1989). Heterogeneity of catalase staining in human hepatocellular peroxisomes. *J Histochem Cytochem* 37:331–337.
- Romero Garcia (2009). Desarrollo de vectores lentivirales para terapia génica del síndrome de hiper-igm ligado al cromosoma x (x-higm1). Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de Granada.
- Rosen J.B., Young A.M., Beuthin F.C., Louis-Ferdinand R.T. (1986) Discriminative stimulus properties of amphetamine and other stimulants in lead-exposed and normal rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 211–5.
- Rossi-George A., Virgolini M.B., Weston D., Cory-Slechta D.A. (2009) Alterations in glucocorticoid negative feedback following maternal Pb, prenatal stress and the combination: a potential biological unifying mechanism for their corresponding disease profiles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 117–27.
- Rossi-George A., Virgolini M.B., Weston D., Thiruchelvam M., Cory-Slechta D.A. (2011) Interactions of lifetime lead exposure and stress: behavioral, neurochemical and HPA axis effects. *Neurotoxicology* 32, 83–99.
- Rotzinger, S., Smith, B.R., Amit, Z. (1994). Catalase inhibition attenuates the acquisition of ethanol and saccharin-quinine consumption in laboratory rats. *Behav. Pharmacol.* 5, 203–209.
- Samson, H. H. & Doyle, T. F. (1985). Oral ethanol self-administration in the rat: Effect of naloxone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22, 91-99.
- Samson H.H. (1986). Initiation of ethanol reinforcement using a sucrose-substitution procedure in food- and watersated rats. *Alcohol Clin Exp Res* 10:436–442.
- Samson A, H. H., Pfeffer, A., & Tolliver, G. A. (1988). Oral Ethanol Self-administration in Rats: Models of Behavior, 12(5), 591–598.
- Samson, H. H., Slawecki, C. J., Sharpe, A. L., & Chappell, A. (1998). Appetitive and Consummatory Behaviors in the Control of Ethanol Consumption : A Measure of Ethanol Seeking Behavior. 1783–1787.
- Samson, H. H., Czachowski, C. L., Slawecki, C. J. (2000). A New Assessment of the Ability of Oral Ethanol to Function as a Reinforcing Stimulus, 24(6), 766–773.
- Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG (1999c) Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: is there a functional link. *Psychopharmacology* 144(1):83–89.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2–38.

- Sanchez-Catalan MJ, Hipolito 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 (Berl)* 204:641–653.
- Sanchez-Catalan, M. J., Kaufling, J., Georges, F., Veinante, P., & Barrot, M. (2014). The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 282C, 198–216.
- Sapag A., Tampier L., Valle-Prieto A, Quintanilla M.E., Moncada, C., & Israel, Y. (2003). Mutations in mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) change cofactor affinity and segregate with voluntary alcohol consumption in rats. *Pharmacogenetics*, 13(8), 509–15.
- Schneider J.S., Lee M.H., Anderson D.W., Zuck L., Lidsky T.I. (2001) Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 896, 48–55.
- Self D.W., Nestler E.J. (1995). Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci.*18:463–95.
- Serrano, E., Pozo, O.J., Beltrán, J., Hernández, F., Font, L., Miquel, M., Aragon, C.M. (2007). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between D-(-)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain rat tissues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1221–1229.
- Shirota, F. N; Nagasawa, H. T; Kwon, C. H y DeMaster, E. G. (1984). Acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog and man. *Metabolism and disposition. Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 12:3 337-344.
- Shirota, F. N, DeMaster, E. G. y Nagasawa, H. T. (1987). Cyanide is a product of the catalase-mediated oxidation of the alcohol deterrent agent, cyanamide. *Toxicology letters.* 37: 1.7-12.
- Sinclair, J. D. y Gribble, P. A. (1985). Cyanamide injections during ethanol deprivation increase alcohol drinking. *Alcohol.* 2: 627-630.
- Sinclair, J. D. (1990). Drugs to decrease alcohol drinking. *Annals of Medicine.* 22:5. 357-62.
- Sing, A.K (1993). Effects of chronic low-level lead exposure on m RNA expression, ADP- ribosylation and photoaffinity labeling with (alpha-32P) Guanine triphosphate gamma azidoamide of GTP binding protein in neurones isolated from the brain of neuronal and adult rats. *Biochem. Pharmacol.* 9:1107:1114.
- Sharifi, A.M., Baniasadi, S., Jorjani, M., Rahimi, F., Bakhshayesh, M. (2002). Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci. Lett.* 329, 45–48.
- Silbergeld, EK; Goldberg, A.M. (1974). Lead induced behavioral dysfunction: an animal model of hyperactivity. *Exp. Neurol* 42:146-147.
- Skinner B.F. (1938). *The behavior of organisms: an experimental analysis.* New York: Appleton- 2053.
- Socaransky, S. M.; Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1985). Brain ALDH as a possible modulator of voluntary ethanol intake. *Alcohol.* 2:2.361-365.
- Somashékaraiah B. V, Padmaja K., Prasad A.R. (1992) Lead-induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 107–14.
- Somani S.M., Husain K, Whitworth C, Trammell G.L., Malafa M, Rybak L.P. (2000). Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol* 86:234–241.

- Soto-Bernardini M.C, Raventós-Vorst H. (2008). Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. *Acta Médica Costarricense*. 4: 197-202.
- Spanagel, R. (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Research & Health*, 24, 124-131.
- Spanagel, R. (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice & Research*, 4, 507-518.
- Spear L.P. (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417-463.
- Strachan T, Read A.P. (1999) *Human Molecular Genetics*, 2nd edn. New York: Wiley-Liss.
- Sugawara E.; Nakamura K; Miyake T, Fukumura A, Seki Y. (1991). Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *British J. Indus. Med.* 48:239-242.
- Sullivan J.T. Individualized treatment of alcohol withdrawal. (1995). *JAMA*. 273(3):183-4.
- Swanson L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321-353
- Tabakoff B, Hoffman P.L. (2000). Animal models in alcohol research. *Alcohol Res Health* 2000;24:77-84.
- Takayama S, Uyeno E.T. (1985). Intravenous self-administration of ethanol and acetaldehyde by rats. *Yakubutsu Seishin Kodo* 5:329-334.
- Tambour, S., Quertemont, E. (2007). Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(1), 9-28.
- Tampier. L. and Mardones. J. (1979) Catalase mediated oxidation of ethanol by rat brain homogenates. *1RCS Medical Sciences* 7, 389-393.
- Tampier, L; Mardones, J. (1987). Absence of effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on blood levels after oral administration in rats. *Alcohol* 4:73-74.
- Tampier, L., Quintanilla, M.E., Mardones, J. (1994). Acetaldehyde metabolism: differences between UChA and UChB rats. *Alcohol Alcohol*. 29, 751-755.
- Tampier E, L. (1995). Acetaldehyde Metabolism by Brain Mitochondria From UChA and UChB Rats, *12(6)*, 519-524.
- Tampier, L., & Quintanilla, M. E. (2002). Effect of a dose of ethanol on acute tolerance and ethanol consumption in alcohol drinker (UChB) and non-drinker (UChA) rats. *Addiction Biology*, 7(3), 279-84.
- Tampier, L., & Quintanilla, M. E. (2009). Effect of concurrent saccharin intake on ethanol consumption by high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Addiction Biology*, 14(3), 276-82
- Tephly, T. R.; Mannering, G. J. y Parks, R.E. (1961). Studies on the mechanism of inhibition of liver and erythrocyte catalase activity by 3-amino-1,2,4-triazole (AT). *Journal Pharmacology Experther*. 134: 77-81.
- Thomasson H.R., Edenberg H.J., Crabb D.W., Mai X.L., Jerome R.E., Li T.K., Wang S.P., Lin Y.T., Lu R.B., Yin S.J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am J Hum Genet* 48:677-681

- Tomkins DM, Sellers (2001). Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. Review EM.CMAJ. 6:817-21.
- Tong S.T.Y and K. Che Lam. (1998). Are nursery schools and kindergartens safe for our kids? The Hong Kong study. The science of the total environment. 216: 217-225.
- Trevitt J.T., Carlson B.B., Correa M, Keene A, Morales M, Salamone J.D. (2002). Interactions between dopamine D1 receptors and g-aminobutyric acid mechanisms in substantia nigra pars reticulata of the rat: neurochemical and behavioral studies. Psychopharmacology 159: 229-237.
- Tolliver, G. A., & Samson, H. H. (1991). The influence of early postweaning ethanol exposure on oral self-administration behavior in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 38, 575-580.
- Tunez I., Montilla P., Del Carmen-Muñoz M., Feijoo M. and Salcedo M. (2004) Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. J. Pineal Res. 37, 252-256.
- Usuda N, Reddy, M.K. Hashimoto T, Rao M.S., Reddy J.K. (1988) Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. Lab Invest 58:100-111
- Valenzuela, A. (1989). Effects of lead acetate on cerebral glutathione peroxidase and catalase in the suckling rat. Neurotoxicology. 10(1): 63-9.
- Valles R., Cardon A.L., Heard H.M., Bratton G.R., Nation J.R. (2003) Morphine conditioned place preference is attenuated by perinatal lead exposure. Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 295-300.
- Van Dam, D. & De Deyn, P.P. (2006). Drug discovery in dementia: The role of rodent models. Nature Reviews Drug Discovery 5, 956-970.
- Van der Staay, F.J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. Brain Research Reviews 52, 131-159.
- Van Dam, D. & De Deyn, P.P. (2006). Drug discovery in dementia: The role of rodent models. Nature Reviews Drug Discovery 5, 956-970.
- Vengeliene, V., Celerier, E., Chaskiel, L., Penzo, F., & Spanagel, R. (2009). Compulsive alcohol drinking in rodents. Addiction Biology, 14(4), 384-96.
- Vetulani J. ( 2001) Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. Review. Pol J Pharmacol. 4:303-17.
- Verina, T., Rohde, C. a, & Guilarte, T. R. (2007). Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. Neuroscience, 145(3), 1037-47.
- Virgolini, M. B., Cancela, L. M., & Fulginiti, S. (1999). Behavioral Responses to Ethanol in Rats Perinatally Exposed to Low Lead Levels, 21(5), 551-557.
- Virgolini, M.B. (1999) Efectos postnatales inducidos por la exposición a plomo durante la gestación y la lactancia en ratas. Tesis Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Virgolini M.B., Volosin M., Fulginiti A.S., Cancela L.M. (2004) Amphetamine and stress responses in developmentally lead-exposed rats. Neurotoxicol. Teratol. 26, 291-303.
- Virgolini, M. B. (2014). Exposición a plomo y adicción a drogas (Lead exposure and drug addiction ), 7(5016), 26-38.

- Vrtunski P, Murray R, Wolin LR, Q. J. (1973). The effect of alcohol on intracranially reinforced response. *Stud Alcohol*. 34(3):718-25.
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66.
- Wise, R.A., Bozarth, M.A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol. Rev.* 94, 469–492.
- Wince L.C., Donovan C.A., Azzaro A.J. (1980) Alterations in the biochemical properties of central dopamine synapses following chronic postnatal PbCO<sub>3</sub> exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 642–50.
- Xie G, Ye J.H. (2012). Salsolinol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the posterior ventral tegmental area of rats. *PLoS One* 7:e36716.
- Yang, Q; De Pierre, J.W. (1998). Papi done-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression purification* 12:277-283.
- Yang, T.; Jiang, X; Zhang, H.J; Li, S; Obeley, L.W. (1998). Use of comercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radical Biol. Med* 6:688-693.
- Yamamoto K, Fahimi H.D. (1987). Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments. *J Cell Biol* 105:713–722.
- Yao, L., Fan, P., Arolfo, M., Jiang, Z., Olive, M. F., Zablocki, J. Diamond, I. (2010). Inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 suppresses cocaine seeking by generating THP, a cocaine use-dependent inhibitor of dopamine synthesis. *Nature Medicine*, 16(9), 1024–8.
- Yokota S, Fahimi H.D. (1981). Immunocytochemical localization of catalase in rat liver. *J Histochem Cytochem* 29:805–812
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu L, Chang C (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem* 251:549-557.
- Yu S.Y., Mizinga K.M., Nonavinakere V.K., Soliman K.F.A. (1996) Decreased endurance to cold water swimming and delayed sexual maturity in the rat following neonatal lead exposure. *Toxicol. Lett.* 85, 135–141.
- Zakhari, S. (2007). Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol, Research and Health*, 29(4): 245–254.
- Zaar K, Völkl A, Fahimi H.D. (1991). Purification of marginal plates from bovine renal peroxisomes: identification with L-hydroxy-acid oxidase B. *J Cell Biol* 113:113–121
- Zenick H., Goldsmith M. (1981) Drug discrimination learning in lead-exposed rats. *Science* 212, 569–71.
- Zimatkin, S.M.y Lindros, K.O. (1989). A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol-related behaviour. *Alcohol*. 6:4 321-325.
- Zimatkin, S.M.y Lindros, K.O. (1990). Features of the brain aldehyde oxidizing system in rats with various alcohol resistance. *Voprosy Narkologii*. 3 20:222.
- Zimatkin SM. (1991) Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J Neurochem* 56:1– 11.

- Zimatkin, S.M., Deitrich, R.A. (1995). Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*: 19:5 1300-1306.
- Zimatkin, S.M., Lindros, K.O. (1996). Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol*. 31, 167-174.
- Zimatkin, S.M., Deitrich, R.A. (1997). Ethanol metabolism in rat brain. *Addict. Biol.* 2, 387-399.
- Zimatkin, S.M., Liopo, A.V., Deitrich, R.A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 1623-1627.
- Zimatkin S.M., Pronko S.P., Vasiliou V, Gonzalez F.J., Deitrich R.A. (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res* 30(9):1500-1505.
- Zurita A, Molina V. (1999). Prior morphine facilitates the occurrence of immobility and anhedonia following stress. *Physiol Behav.* 65(4-5):833-7.