

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMECÈUTICA

EFFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL: PAPEL
DEL ACETALDEHÍDO Y DE LOS RECEPTORES OPIOIDES.
ESTUDIOS EN EL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL DE LA
RATA.

MARÍA JOSÉ SANCHÉZ CATALÁN

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de juliol de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Carlos Manuel González Aragón
- Dra. Consuelo Guerri Sirera
- Dra. Mercé Correa Sanz
- Dr. Enrique Lanuza Navarro
- Dr. Teodoro Zornoza Sabina

Va ser dirigida per:

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá

©Copyright: Servei de Publicacions
María José Sánchez Catalán

I.S.B.N.: 978-84-370-8505-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

**EFFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL:
PAPEL DEL ACETALDEHÍDO Y DE LOS
RECEPTORES OPIOIDES. ESTUDIOS EN EL ÁREA
TEGMENTAL VENTRAL DE LA RATA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA JOSÉ SÁNCHEZ CATALÁN

JULIO 2011



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

**EFFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL:
PAPEL DEL ACETALDEHÍDO Y DE LOS RECEPTORES
OPIOIDES. ESTUDIOS EN EL ÁREA TEGMENTAL
VENTRAL DE LA RATA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA JOSÉ SÁNCHEZ CATALÁN

2011



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Los que suscriben, Dra. Ana Polache Vengut y Dr. Luis Granero Maciá,
Profesores Titulares del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por Dña. María José Sánchez Catalán que lleva por título: "Efectos neuroconductuales del etanol: papel del acetaldehído y de los receptores opioides. Estudios en el área tegmental ventral de la rata" ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Valencia, a 31 de Mayo de 2011

Fdo.

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a los Proyectos:

“Inducción del citocromo P4502E1 y salsolinol: implicaciones neuroquímicas y comportamentales en el alcoholismo”, financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo).

“Nuevas aproximaciones terapéuticas en el alcoholismo: papel del metabolismo cerebral del etanol en sus efectos neurobiológicos”, financiado por la FEPAD (Conselleria de Sanidad, Generalitat Valenciana).

“Papel de la interacción dopamina-opioides en el refuerzo. Estudios neuroquímicos comparativos con reforzantes naturales (feromonas sexuales) y drogas de abuso (etanol)”, financiado por la Dirección General de Investigación (Ministerio de Educación y Ciencia).

Y con la ayuda de dos becas predoctorales de investigación: “V segles” (Universidad de Valencia (2008-2011) y beca FEPAD asociada al proyecto arriba indicado (2007).

El Dr. Fernando Martínez García, Catedrático del Departamento de Biología Funcional y Antropología Física (Facultad de Biología, Universidad de Valencia) ha actuado como tutor de la doctoranda, bajo el programa de Neurociencias básicas y aplicadas.

A Ana y Luis

A mi familia

A Roberto

"Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano"

Isaac Newton

Escribir estas líneas puede que sea una de las partes más placenteras de este proceso, a la par que difícil es transmitir tanta gratitud en unas pocas palabras.

A Ana y Luis por vuestro esfuerzo, trabajo, paciencia... Por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto académico e iniciarme científicamente. Por ser directores y amigos, porqué de vosotros he aprendido algo más que ciencia. Estoy y estaré infinitamente agradecida con vosotros.

A Lucía y Mary Joe por enseñarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio y haberme dedicado vuestro tiempo.

A Lucía Jr, Isabella, Alex y Tedy, porqué ha sido un inmenso placer trabajar con vosotros, así como compartir tantos buenos momentos en este grupo, especialmente los que han sido bañados con café y chocolate.

Al personal del Departamento por su colaboración durante este proceso.

A Chelo, Fernando y Quique por su siempre dispuesta colaboración.

Mi estancia en Alemania en el laboratorio del Prof. Rainer Spanagel no sólo me ofreció una experiencia profesional, sino también personal, durante la cual conocí a gente estupenda. Fue un placer unir los codos (y las cervezas) con Ainhoa y Manuela.

A mis padres, porqué son los principales responsables de que yo haya podido progresar académica y personalmente. Por darme las ganas de aprender y enseñarme el significado de esfuerzo y trabajo. Gracias por darme todo aquello que vosotros no pudisteis tener.

A mi familia, en especial a mi hermana y Juan, por su comprensión y apoyo a lo largo de todos estos años.

A la familia de Roberto por convertirse en la mía y considerarme como una más en su casa.

Y ¿cómo no?, a mi "vecino-familia".

A mis amigas y amigos, por escucharme y animarme, en especial a "Lo mejórico" por las charlas con y sin cervezas, las cenas y comidas, los viajes...

A Roberto, por su infinita paciencia, comprensión, ánimo, sacrificio...

Sencillamente por estar ahí y hacer que "merezca la pena".

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	I
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	5
1.1. METABOLISMO CEREBRAL DEL ETANOL	7
1.1.1. Alcohol deshidrogenasa	8
1.1.2. Catalasa	9
1.1.3. Citocromo P4502E1.....	11
Expresión y distribución cerebral.....	13
Inducción enzimática	15
1.2. PAPEL DEL ACETALDEHÍDO EN LOS EFECTOS COMPORTAMENTALES DEL ETANOL.....	18
1.2.1. Efectos del etanol sobre el comportamiento y su modulación mediante la manipulación de su metabolismo cerebral.	19
1.2.2. Secuestro o inactivación del acetaldehído y modulación de los efectos del etanol sobre el comportamiento	29
1.3. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO EN LOS EFECTOS ESTIMULANTES MOTORES DEL ETANOL	30
1.4. BREVE RECORDATORIO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL.....	33
1.4.1. Principales aferencias y eferencias del VTA.....	35
Aferencias al VTA.....	36
Eferencias del VTA.....	37
1.4.2. Influencias locales en la actividad de las neuronas VTA	38
1.4.3. Organización de la proyección dopaminérgica VTA → estriado ventral: localización de los cuerpos celulares en función de las áreas de proyección.	40

1.4.4. Neuronas DA del VTA: propiedades electrofisiológicas y función.	43
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	53
3.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO.....	53
3.2.1. Diseño experimental.....	53
Experimento 1. Determinación de los niveles de expresión basal del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata	54
Experimento 2. Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata	55
3.2.2. Determinación de los niveles de CYP2E1 en las muestras biológicas.....	56
Materiales y Soluciones de trabajo.....	56
Procedimiento.....	61
<i>Lisado y determinación de la cantidad de proteína.....</i>	<i>61</i>
<i>Preparación de geles y siembra.....</i>	<i>62</i>
<i>Electroforesis, transferencia, revelado y cuantificación.....</i>	<i>63</i>
3.2.3. Expresión de los resultados y análisis estadístico	65
Experimento 1	65
Experimento 2	65
3.3. ACETALDEHIDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL. PAPEL DEL VTA Y DE LOS RECEPTORES OPIOIDES.....	66
3.3.1. Soluciones de trabajo y sustancias químicas empleadas.....	67
3.3.2. Método quirúrgico	69
3.3.3. Diseño experimental.....	71

Experimento 3. Efectos de la administración intra-VTAp aguda de etanol o acetaldehído sobre la actividad locomotora de la rata.....	71
Experimento 4. Estudio de la participación de los receptores opioides en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.....	72
Experimento 5. Estudio de la participación de los receptores opioides de tipo μ en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.....	73
<i>Experimento 5A: Capacidad de la β-Funaltrexamina para suprimir los efectos activadores producidos por el etanol y el acetaldehído</i>	<i>73</i>
<i>Experimento 5B: Eficacia del bloqueo de los receptores opioides μ por la β- Funaltrexamina</i>	<i>74</i>
Experimento 6. Efectos del secuestro del acetaldehído sobre la activación comportamental derivada de la administración intra-VTAp de etanol.....	74
<i>Experimento 6A: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol</i>	<i>75</i>
<i>Experimento 6B: Efecto de la administración sistémica de la D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de DAMGO.....</i>	<i>75</i>
Experimento 7. Efectos del etanol a bajas dosis sobre la actividad locomotora de las ratas en presencia de D-Penicilamina.....	76
<i>Experimento 7A: Efecto de la administración intra-VTAp aguda de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora</i>	<i>76</i>
<i>Experimento 7B: Efecto de la administración intra-VTAp aguda de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora en presencia de D-Penicilamina.....</i>	<i>77</i>
Experimento 8. Estudio de los fenómenos de sensibilización y/o tolerancia comportamental tras la administración repetida intra-VTAp de etanol.....	77

<i>Experimento 8A: Protocolo de administración 1. Estudios con etanol.</i>	77
<i>Experimento 8B: Protocolo de administración 1. Estudios con DAMGO.</i>	78
<i>Experimento 8C. Protocolo de administración 2. Estudios con etanol.</i>	79
3.3.4. Procedimiento experimental	80
Manipulación de los animales: procedimiento de habituación	80
Procedimiento de microinyección intra-VTAp	81
Procedimiento de evaluación de la actividad locomotora	82
3.3.5. Validación histológica	83
Experimentos 3, 4 y 5	83
Experimentos 6, 7, y 8	85
3.3.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico	86
Experimentos 3, 4 y 5	86
Experimento 6	86
Experimento 7	87
Experimento 8	87
4. RESULTADOS	89
4.1. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO	91
4.1.1. Experimento 1. Determinación de los niveles de expresión basal del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata	91
4.1.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata	97
4.2. ACETALDEHIDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL. PAPEL DEL VTA Y DE LOS RECEPTORES OPIOIDES	100

4.2.1. Experimento 3. Efectos de la administración intra-VTAp aguda de etanol o acetaldehído sobre la actividad locomotora de la rata	100
Validación histológica	100
Evaluación de la actividad locomotora	102
4.2.2. Experimento 4. Estudio de la implicación de los receptores opioides en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.....	103
Validación histológica	103
Evaluación de la actividad locomotora	105
4.2.3. Experimento 5. Estudio de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.....	106
Experimento 5A: Capacidad de la β -Funaltrexamina para suprimir los efectos activadores producidos por el etanol y el acetaldehído.....	106
<i>Validación histológica</i>	106
Experimento 5B: Eficacia del bloqueo de los receptores opioides μ por la β - Funaltrexamina.....	109
<i>Validación histológica</i>	109
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	111
4.2.4. Experimento 6. Efectos de la D-penicilamina sobre la activación locomotora inducida por etanol.....	112
Experimento 6A: Efecto de la administración sistémica de D-pencilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol.....	112
<i>Validación histológica</i>	112
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	114
Experimento 6B: Efecto de la administración sistémica de la D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de DAMGO.....	116
<i>Validación histológica</i>	116

4.2.5. Experimento 7. Efectos del etanol a bajas dosis sobre la actividad locomotora en presencia de D-penicilamina.....	119
Experimento 7A: Efecto de la administración aguda intra-VTAp de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora.....	119
<i>Validación histológica</i>	119
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	121
Experimento 7B: Efecto de la administración aguda intra-VTAp de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora en presencia de D-Penicilamina.....	122
<i>Validación histológica</i>	122
4.2.6. Experimento 8. Estudio de los fenómenos de sensibilización y/o tolerancia comportamental tras la administración repetida intra-VTA de etanol	125
Experimento 8A: Protocolo de administración 1. Estudios con etanol..	125
<i>Validación histológica</i>	125
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	127
Experimento 8B: Protocolo de administración 1. Estudios con DAMGO.	129
<i>Validación histológica</i>	129
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	130
Experimento 8C. Protocolo de administración 2. Estudios con etanol..	132
<i>Validación histológica</i>	132
<i>Evaluación de la actividad locomotora</i>	134
5. DISCUSIÓN.....	139
5.1. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO.....	142
5.2. ACETALDEHÍDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL.....	145

5.2.1. Activación locomotora producida por etanol y acetaldehído: papel del VTAp.....	145
5.2.2. Implicación de los receptores opioides en los efectos estimulantes del etanol y del acetaldehído	149
5.2.5. Una hipótesis de trabajo sobre cómo el etanol excita las neuronas DA de VTA.....	157
6. SUMMARY AND CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

ACD, acetaldehído

aCSF, fluido cerebroespinal artificial

ADH, alcohol deshidrogenasa

ALDH, aldehído deshidrogenasa

β-FNA, β-Funaltrexamina

BNST, núcleo del lecho de la estría terminal

CAT, catalasa

CL, núcleo central lineal

CYP2E1, citocromo P4502E1

DP, D-Penicilamina

ETOH, etanol

fr, fascículo retroflexo

IF, núcleo interfascicular

i.p., intraperitoneal

IP, núcleo interpeduncular

IPF, fosa interpeduncular

KO, knockout

LDT, núcleo tegmental laterodorsal

LH, hipotálamo lateral

LHA, área hipotalámica lateral

MCLD, sistema dopaminérgico mesocorticolímbico

ml, lemnisco medial

MT, núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio

NAc, núcleo accumbens

Neuronas DA, neuronas que liberan dopamina

Neuronas GABA, neuronas que liberan GABA

Neuronas Glu, neuronas que liberan glutamato

NTX, naltrexona

PB, tampón fosfato

PBP, área pigmentada parabraquial

PBS, tampón salino fosfato

PHA, área hipotalámica posterior

PIF, núcleo parainterfascicular del VTA

PN, núcleo paranigral

POMC, proopiomelanocortina

PFC, corteza prefrontal

PFR, área adyacente al fascículo retroflexo

PPTg, núcleo tegmental pedunculopontino

PSA, persulfato amónico

PVDF, polivinilfluoruro

R, núcleo rojo

RIPA, Radio Immune Precipitation Assay

RL, núcleo rostral lineal del rafe

II

RR, núcleo retrorubral

RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

Sal, salsolinol

SC, colículo superior

scp, pedúnculo cerebeloso superior

SDS, dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE, SDS-gel de poliacrilamida de electroforesis

SN, substantia nigra

SNpc (SNC), substantia nigra pars compacta

SNpr (SNR), substantia nigra pars reticulata

SUM, núcleo supramamilar

sumd, decusación supramamilar

TBS, tampón salino de trizma

TBST, tampón salino de trizma y tween

THIQs, tetrahidroisoquinolinas

vHip, hipocampo ventral

VP, pálido ventral

VTA, área tegmental ventral

VTAA, área tegmental ventral anterior

VTAp, área tegmental ventral posterior

vtd, decusación tegmental ventral

VTT, cola del tegmento ventral

WT, wild-type

INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es uno de los problemas sanitarios de mayor coste para las sociedades desarrolladas. Es lógico, pues, que debido al impacto negativo que esta droga presenta para la sociedad, se hayan desarrollado gran cantidad de estudios con el fin de comprender cómo interactúa el etanol con el cerebro y cuáles pueden ser las dianas más idóneas para el desarrollo de terapias eficaces en el tratamiento de la adicción al etanol.

Uno de los aspectos que se ha mostrado muy útil para entender cómo el consumo continuado de etanol puede desembocar en el alcoholismo ha sido el concerniente al modo en cómo el etanol altera el funcionamiento del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (MCLD). Este hecho no es extraño, ya que los cambios permanentes que las drogas generan en este sistema tras su uso crónico se consideran, a día de hoy, los responsables de muchos de los comportamientos observados en el adicto. Un paso previo en el estudio de estos cambios persistentes generados por el consumo crónico de las drogas de abuso ha sido la descripción del mecanismo de acción de las mismas, es decir, se ha intentado en primer lugar entender cómo la droga en cuestión (el alcohol en nuestro caso) afecta la actividad del sistema MCLD. Y, en concreto, un aspecto que siempre se ha intentado determinar con gran detalle para todas y cada una de las drogas de abuso ha sido el mecanismo a través del cual, una droga determinada, es capaz de producir una activación desproporcionadamente elevada de las neuronas que liberan dopamina (neuronas DA) en este sistema. En este tipo de estudios se ha utilizado básicamente la administración aguda de la droga analizada por diferentes vías, incluyendo las administraciones localizadas en el propio sistema MCLD. Como veremos, a pesar de la gran cantidad de trabajo desarrollado por la comunidad científica, el mecanismo a través del cual el etanol activa las neuronas del sistema MCLD, no se conoce completamente, siendo todavía, a día de hoy, materia de debate en los foros especializados.

La literatura científica ofrece evidencias que, en conjunto, subrayan la capacidad del etanol para interactuar con muy diferentes sistemas neuroquímicos. Entre sus dianas encontramos receptores de neurotransmisores tan importantes como el GABA o el glutamato, (receptores GABA_A y NMDA, respectivamente), el receptor 5HT₃ de la serotonina, el

receptor nicotínico de la acetilcolina, así como diversos canales iónicos operados por voltaje como algunos tipos de canales de Ca^{2+} y de K^+ . Algunas de estas interacciones se han vinculado con la capacidad del etanol para activar las neuronas DA del sistema MCLD.

Sin embargo, la literatura científica también ofrece evidencias de que los efectos activadores del etanol sobre estas neuronas DA podrían atribuirse, no al etanol en sí, sino a su metabolito principal: el acetaldehído. En secciones posteriores intentaremos revisar, especialmente, estas últimas evidencias.

1. ANTECEDENTES

El presente capítulo se ha estructurado en cuatro secciones principales, con la intención de mostrar los aspectos fundamentales que permitan la comprensión del cómo y el porqué de los experimentos desarrollados en la presente Tesis. Estas secciones son: 1. Metabolismo cerebral del etanol, 2. Papel del acetaldehído en los efectos comportamentales del alcohol, 3. Implicación del sistema opioide endógeno en los efectos estimulantes del etanol y 4. Breve recordatorio de la estructura y función del área tegmental ventral, VTA.

1.1. METABOLISMO CEREBRAL DEL ETANOL

Aunque la existencia de un metabolismo hepático como parte fundamental de la eliminación del etanol era un hecho bien descrito en la literatura farmacocinética y toxicológica desde los años 50 del siglo pasado (Jacobsen. 1952), no fue hasta principios de los años 70 cuando Raskin y Sokoloff (Raskin y Sokoloff. 1970) postularon por primera vez que el etanol podía metabolizarse también *in situ* en el cerebro. Esta propuesta se basó en la detección en el cerebro de uno de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo del etanol.

Actualmente, como muestra la Figura 1.1, se acepta que son tres los sistemas enzimáticos involucrados en la biotransformación del etanol: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P450E1 (CYP2E1) y la catalasa (CAT). Todos ellos participan, en distinta medida, no sólo en el metabolismo hepático del etanol sino, también, en el cerebral.

Desde el hallazgo de Raskin y Sokoloff, la presencia de estos sistemas enzimáticos en el **cerebro** ha sido demostrada en repetidas ocasiones y por diferentes laboratorios. Aunque la contribución exacta de cada uno de ellos no ha sido definitivamente establecida, a día de hoy se puede afirmar que el metabolismo cerebral del etanol es un fenómeno plenamente demostrado.

Se han empleado diferentes metodologías experimentales que han permitido no sólo evidenciar la presencia de esta maquinaria enzimática, sino también

analizar su localización y distribución cerebral, destacando entre ellas las técnicas inmunohistoquímicas, la hibridación *in situ*, el *immunoblotting* y la RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). A continuación revisaremos los principales hallazgos aparecidos en la bibliografía en los últimos años relativos, no sólo a la presencia, sino también a la participación concreta de cada uno de los sistemas involucrados en el metabolismo del etanol a nivel cerebral, prestando una especial atención a los datos referentes al CYP2E1.

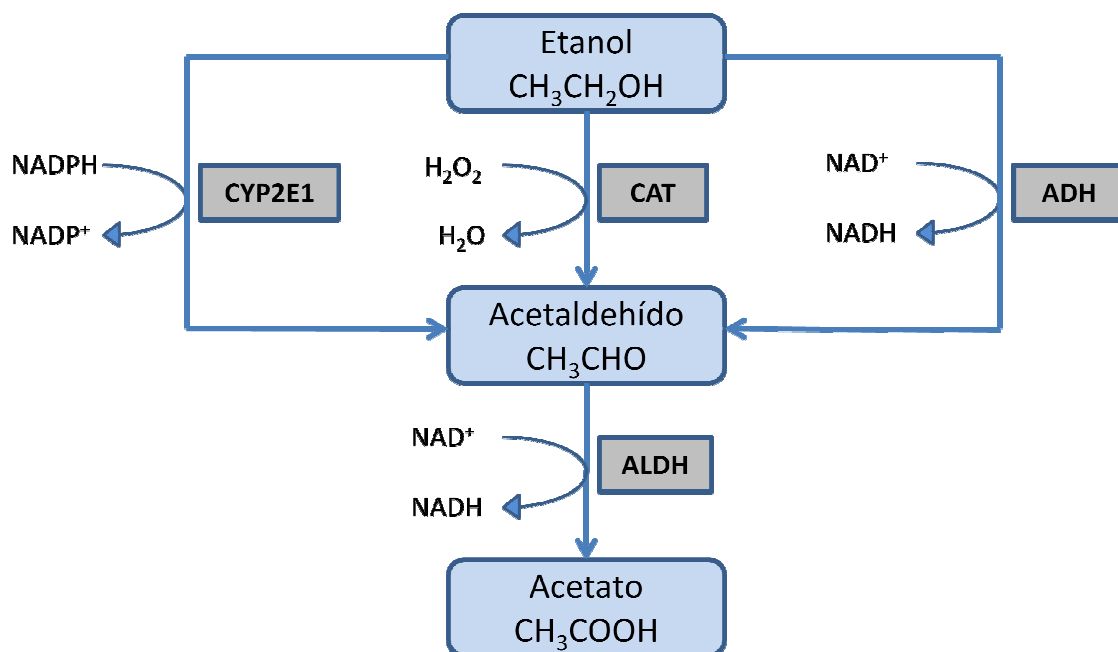


Figura 1.1: Mecanismos enzimáticos responsables del metabolismo del etanol.

1.1.1. Alcohol deshidrogenasa

La presencia de ADH en el cerebro fue demostrada por primera vez en 1970 (Raskin y Sokoloff, 1970). La ADH es una enzima citosólica que cataliza la conversión de etanol a acetaldehído en una reacción acoplada con la transformación de NAD^+ a NADH (Figura 1.1). Esta enzima constituye el

principal sistema oxidativo del etanol en el hígado de mamíferos (Jacobsen. 1952; Lands. 1998; Ramchandani y col. 2001). Sin embargo, la ADH realiza una contribución minoritaria al metabolismo cerebral del etanol, tal y como algunos estudios bioquímicos (Zimatkin y col. 2006) y comportamentales (Escarabajal y Aragón. 2002b) han mostrado. Es por ello que apenas nos referiremos a este sistema en la presente sección.

Sí queremos recordar, sin embargo, que se han descrito diversas isoformas de la ADH en el cerebro de mamíferos, principalmente la ADH III (Beisswenger y col. 1985; Boleda y col. 1989), pero no las isoformas I y IV (Galter y col. 2003). Aunque, se ha demostrado que sus correspondientes mRNA están confinados en algunas poblaciones celulares en regiones concretas del cerebro (Martinez y col. 2001), lo cual sugiere una expresión diferencial dependiente de la región cerebral considerada.

1.1.2. Catalasa

La catalasa, localizada en los peroxisomas, cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído mediante el empleo de peróxido de hidrógeno (Tampier y Mardones. 1986). La **catalasa es la principal enzima de oxidación del etanol en el cerebro**, siendo responsable de aproximadamente el 60% del metabolismo cerebral del etanol (Zimatkin y col. 2006). Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas no parece tener una gran implicación a nivel hepático, puesto que el pretratamiento con inhibidores de la catalasa no produce alteraciones significativas en la farmacocinética del etanol (Tampier y Mardones. 1987; Aragón y col. 1989).

La implicación de la catalasa en la biotransformación del etanol se demostró inicialmente de un **modo indirecto**, es decir, se pudo implicar a la catalasa en la biotransformación del etanol cuando se comprobó que el etanol era capaz de prevenir la inhibición del enzima mediada por inhibidores específicos de la misma tanto en condiciones *in vitro* (Cohen y col. 1980) como *in vivo* (Aragón y col. 1991b).

La participación de la catalasa en la oxidación del etanol se ha demostrado también de un **modo directo**. Esto se consiguió, por primera vez, a finales de la década de los 80, mediante la medida de la producción de acetaldehído en los homogeneizados de cerebro en presencia y ausencia de inhibidores de la catalasa. De este modo, se pudo demostrar que el metanol y el aminotriazol reducían significativamente la producción de acetaldehído en los homogeneizados de cerebro de rata (Tampier y col. 1988). Aunque este primer estudio fue criticado por la falta de un control estricto sobre la formación artefactual de acetaldehído, es indudable que sirvió de punto de partida para que, años más tarde, Gill y col. realizaran un estudio más detallado y con un mayor control sobre las variables experimentales críticas. En este estudio se presentaron evidencias claras que demostraban que el acetaldehído se produce en el cerebro principalmente a través de la acción de la catalasa (Gill y col. 1992).

Desde entonces, gran cantidad de evidencias experimentales han corroborado estas observaciones iniciales. La modulación farmacológica de la actividad de la catalasa se ha empleado profusamente no sólo para demostrar el papel de esta enzima en el metabolismo cerebral del etanol, sino también para el estudio de la participación de los derivados metabólicos del etanol en la génesis de sus efectos comportamentales (ver epígrafe 1.2). La modulación farmacológica se ha realizado fundamentalmente mediante el empleo de inhibidores, aunque también se ha procedido en algunos estudios a la promoción de su actividad.

El bloqueo de la actividad de la catalasa se ha realizado *in vivo* mediante la administración aguda, normalmente intraperitoneal (i.p.), de 3-amino-1, 2, 4-triazol, azida sódica, 4-hidroxipirazol o cianamida o mediante la administración crónica de acetato plomo. Estos mismos agentes se han empleado *in vitro* en experimentos bioquímicos dirigidos al estudio de la participación de la catalasa en el metabolismo cerebral del etanol. (Markovac y Goldstein. 1988; Aragón y col. 1991b; Gill y col. 1992; Person y col. 2000; Correa y col. 2004b; Zimatkin y col. 2006). Por su parte, la administración aguda de acetato de plomo o la administración crónica de cianamida, han sido las estrategias más utilizadas para producir un aumento en la actividad catalítica de la catalasa (Correa y col. 1999b; Sanchís-Segura y col. 1999b; Correa y col. 2004b; Correa y col. 2005),

aunque existen otras sustancias, como el ácido 3-nitropropiónico, que han sido empleadas también en estos estudios (Manrique y col. 2006a). Otra metodología empleada para promocionar la actividad de la catalasa ha sido el incremento de los niveles de H₂O₂ mediante hiperoxia normobárica (Pastor y col. 2002).

La presencia de la catalasa parece extenderse a múltiples áreas del cerebro de los mamíferos. La distribución cerebral de la catalasa fue estudiada inicialmente mediante métodos bioquímicos (Gaunt and de Duve. 1976; Brannan et al. 1981). Estos estudios sugerían una distribución bastante uniforme a lo largo del cerebro. La aplicación, años más tarde, de métodos inmunocitoquímicos para el estudio de la distribución regional de la catalasa reveló un cierto paralelismo con los datos bioquímicos previamente encontrados. Así, Moreno y col. (Moreno y col. 1995) detectaron inmunoreactividad en todas las estructuras neuronales analizadas, tanto a nivel neuronal como glial, siendo ciertos tipos neuronales más reactivos que otros. Merece la pena resaltar que, en este estudio, las neuronas de VTA mostraron inmunoreactividad aunque en un grado marcadamente inferior al hallado en otras regiones como el *locus coeruleus* o la *sustancia nigra pars reticulata*. Otros autores también han demostrado por medios inmunocitoquímicos la presencia de catalasa en el cerebro, fundamentalmente en los peroxisomas de neuronas adrenérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas del tronco cerebral (Zimatkin y Lindros. 1996).

1.1.3. Citocromo P450E1

El CYP2E1 es uno de los citocromos P450 más relevantes en cuanto a su implicación en el metabolismo de xenobióticos en el sistema nervioso central. Es responsable de aproximadamente el 20% del metabolismo cerebral del etanol (Zimatkin y col. 2006), situándose, pues, en segundo lugar en

importancia tras la catalasa. A nivel hepático constituye también el segundo sistema en importancia tras la ADH.

La participación del CYP2E1 en el metabolismo del etanol se postuló a finales de la década de los años 60, cuando se demostró que la ingesta de etanol producía la proliferación del retículo endoplasmático liso hepático en humanos y en ratas (Lane y Lieber. 1966; Rubin y Lieber. 1967; Rubin y col. 1968), lo que insinuaba una implicación de los sistemas microsomales en la oxidación del etanol. Existen diferentes isoformas del citocromo P450 inducibles por etanol que han sido purificadas por diferentes laboratorios en conejos (Koop y col. 1982), ratas (Ryan y col. 1984) y humanos (Wrighton y col. 1986). Fue el grupo de Nelson y col. (Nelson y col. 1993) el que propuso por primera vez que estas isoformas inducibles por etanol se denominaran CYP2E1. A pesar del papel prevalente del CYP2E1 en la oxidación microsomal del etanol, hay otras isoenzimas que también contribuyen a la oxidación del etanol en conejos (Koop y Coon. 1984), ratas (Johansson y Ingelman-Sundberg. 1988) y humanos (Lasker y col. 1987), como por ejemplo las isoformas CYP1A2 (Kunitoh y col. 1993; Asai y col. 1996; Salmela y col. 1998) y CYP3A4 (Salmela y col. 1998).

Aunque desde la descripción de la participación del CYP2E1 en el metabolismo hepático del etanol se consideró posible la participación de este sistema en el metabolismo cerebral del etanol, algunos trabajos publicados a principios de los años 90 (Aragón y col. 1992; Gill y col. 1992; Hamby-Mason y col. 1997) pusieron en duda dicha contribución. Recientemente, sin embargo, diferentes estudios han presentado datos sólidos que sostienen la participación de esta enzima en el metabolismo oxidativo del etanol a nivel cerebral. Por ejemplo, Zimatkin y col. (Quertemont y col. 2005a) han mostrado, mediante el empleo de diferentes metodologías, que no sólo la catalasa, sino también el CYP2E1 participa en el metabolismo oxidativo del etanol. De acuerdo con los resultados de este estudio, la producción de acetaldehído a partir de etanol disminuye en los homogeneizados de cerebro de ratones con deficiencia genética en catalasa, en CYP2E1 o en ambas enzimas. Además, la incubación de homogeneizados de cerebro de roedores con NADPH incrementa la oxidación de etanol en la fracción microsomal, mientras que la incubación de dichos homogeneizados con inhibidores del CYP2E1 reduce la oxidación del etanol.

Otros autores también han comprobado que la incubación de los microsomas cerebrales de ratones deficientes en CYP2E1 junto con etanol da lugar a menores niveles de acetaldehído que la incubación del etanol con microsomas cerebrales de ratones normales (Vasiliou y col. 2006). De este modo, puede considerarse que la participación del CYP2E1 para metabolizar el etanol en el cerebro está sólidamente demostrada actualmente.

Expresión y distribución cerebral

La presencia de CYP2E1 en el cerebro se demostró inicialmente mediante estudios inmunocitoquímicos al inicio de los años 90 (Hansson y col. 1990). Tras su detección en cerebro, numerosos grupos de investigación procedieron no sólo a realizar su caracterización bioquímica sino también a estudiar su distribución regional y su susceptibilidad a la inducción, con la finalidad de comprender cuál era su contribución real en los fenómenos de biotransformación de xenobióticos en el sistema nervioso central.

El CYP2E1 se expresa ampliamente en el cerebro de roedores (Hansson y col. 1990; Tindberg y Ingelman-Sundberg. 1996) humanos y primates (Farin y Omiecinski. 1993; McFayden y col. 1998; Upadhya y col. 2000; Howard y col. 2003; Joshi y Tyndale. 2006). Sin embargo, los diferentes estudios revelan importantes discrepancias en cuanto a su localización regional y celular, que, en parte, podrían atribuirse al empleo de diferentes técnicas para su detección (RT-PCR, hibridación *in situ*, *immunoblotting*, inmunocitoquímica), a la diferente especificidad de los anticuerpos empleados, así como al empleo de diferentes especies (roedores, primates, humanos).

Sin embargo, todos los estudios revisados parecen coincidir en señalar que los niveles de expresión cerebral del CYP2E1 son menores que los hallados en hígado. No obstante, existen importantes diferencias en relación al nivel de expresión encontrado a nivel cerebral. Así, algunos estudios muestran niveles de expresión muy bajos en relación a los hepáticos (Hansson y col. 1990; Warner y Gustafsson. 1994; Roberts y col. 1994; Montoliu y col. 1995; Tindberg

y Ingelman-Sundberg. 1996; Yadav y col. 2006), mientras que otros indican que los niveles de esta enzima en cerebro son del orden del 25% de los encontrados a nivel hepático (Anandatheerthavarada y col. 1993; Upadhyay y col. 2000).

Las dos metodologías más ampliamente usadas para el estudio de la distribución cerebral del CYP2E1 han sido el *immunoblotting* y la inmunocitoquímica. La primera permite medir los niveles del enzima en regiones específicas del cerebro, mientras que la segunda permite, en principio, obtener información relativa al tipo celular que expresa CYP2E1. Diversos autores han demostrado, mediante el empleo de ambas metodologías, que la distribución de esta enzima en cerebro es claramente diferente en función de la región del cerebro y del tipo celular considerados (Hansson y col. 1990; Sohda y col. 1993; Tirumalai y col. 1998; Howard y col. 2003; Joshi y Tyndale. 2006; Yadav y col. 2006). En este sentido, es llamativa la escasez de estudios específicos que analicen en detalle la expresión constitutiva de esta enzima en el sistema MCLD. Existen algunos estudios inmunocitoquímicos que muestran inmunoreactividad para el CYP2E1 en núcleo accumbens (NAc) de rata (Hansson y col. 1990; Joshi y Tyndale. 2006) y en el citoplasma de células en VTA y *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Riedl y col. 1996), pero cabe destacar la discrepancia de resultados entre estos estudios. Así, Hansson y col. obtuvieron una elevada intensidad de marcaje en NAc de rata, mientras que Joshi y Tyndale obtuvieron bajas señales en NAc utilizando el mono como animal de experimentación. En cuanto a los estudios que emplean *immunoblotting* como metodología experimental, los resultados publicados son también dispares: algunos autores no detectan inmunoreactividad para el CYP2E1 en el estriado y la corteza cerebral de rata (Yadav y col. 2006), mientras que otros encuentran niveles elevados de CYP2E1 en ambas regiones (Howard y col. 2003). No existen, que sepamos, estudios que empleando *immunoblotting* hayan analizado los niveles de expresión de CYP2E1 en NAc y VTA.

Inducción enzimática

El CYP2E1 es una enzima fácilmente inducible por el etanol. Sin embargo, la magnitud del fenómeno de inducción es todavía materia de debate, a tenor de los resultados publicados hasta la fecha (Anandatheerthavarada y col. 1993; Sohda y col. 1993; Warner y Gustafsson. 1994; Roberts y col. 1994; Bhagwat y col. 1995; Tindberg y Ingelman-Sundberg. 1996; Upadhya y col. 2000; Howard y col. 2003; Kapoor y col. 2006; Yadav y col. 2006).

El patrón de inducción de esta enzima en el cerebro se ha estudiado mediante el empleo de diversas metodologías y haciendo uso de diferentes protocolos y agentes farmacológicos para conseguir la inducción. En la tabla 1.1 se resumen los resultados de los estudios realizados tanto en condiciones *in vivo* (en cerebro de rata) como *in vitro*. Los resultados se han clasificado según la técnica empleada, la pauta de tratamiento con etanol seguida, así como la región concreta y el tipo celular afectado. Globalmente, los resultados indican que la enzima se induce por el etanol, bajo condiciones *in vivo*, en corteza, hipocampo, ganglios basales, estriado, bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo, y bajo condiciones *in vitro*, tanto en cultivos celulares neuronales como gliales. No obstante, se han obtenido algunos resultados contradictorios. Probablemente, las diferencias en las variables metodológicas explican las discrepancias en los resultados obtenidos (ver Hipólito y col. 2007).

No existen muchos estudios que específicamente hayan analizado, mediante la técnica de *Western Blot*, la inducción del CYP2E1 en el sistema MCLD, siendo además los resultados que han ofrecido contradictorios. Por ejemplo, en dos estudios se detectó inducción enzimática en la corteza cerebral de rata (Howard y col. 2003; Upadhya y col. 2000). Por el contrario, otros autores no fueron capaces de detectar inducción en esta misma zona (Yadav y col. 2006). Además, no existen, que sepamos, datos publicados que analicen la posibilidad de la inducción de esta enzima en NAc y VTA utilizando la técnica de *Western blot*.

Tabla 1.1: Inducción del CYP2E1 por etanol *in vivo* (cerebro de rata) e *in vitro*

INDUCCIÓN DEL CYP2E1 POR ETANOL			
Técnica	Tratamiento	Región celular o tipo celular inducido ⁽¹⁾	Ref.
Western blot (Expresión de proteína)			
	Etanol agudo i.p.(0.8 ml/ kg)	Microsomas del lóbulo olfatorio	(Warner y Gustafsson. 1994)
	Dieta líquida de Lieber y DeCarli (3 semanas)	Microsomas aislados de cerebro completo	(Roberts y col. 1994)
	Etanol 10% (v/ v) en solución con sacarosa 1% (W/V) (30 días)	Corteza	(Upadhya y col. 2000)
	Etanol intragástrico (3g/ kg/ día, durante 7 días)	Bulbo olfatorio (x1.7), corteza frontal (x2), hipocampo (x1.9), cerebelo (x1.8), estriado (x1.4)	(Howard y col. 2003)
	Etanol (25 mM, durante 48 h)	Cultivos celulares neuronales (x1.2) y cultivos celulares gliales (x1)	(Kapoor y col. 2006)
Actividad catalítica			
CZN- h ⁽²⁾	Etanol agudo intragástrico (3g/ kg)	Homogeneizados de hipocampo (x1.8)	(Tindberg e Ingeldman-Sundberg 1996)
	Exposición a etanol (25 o 100 mM, durante 24h)	Cultivos corticales gliales (x4 -2 5mM, x6 -1 00mM)	(Tindberg y Ingelman-Sundberg. 1996)
	Etanol 10% (v/ v) en solución con sacarosa (1% W/V) (30 días)	Hipocampo (x2), corteza (x1.8), y tronco cerebral (disminución)	(Upadhya y col. 2000)
NMDA-d ⁽³⁾	Etanol 2% (v/v) en solución con sacarosa 1% (3 días). Etanol elevado al 5% (1 semana). Etanol elevado al 10% (30 días)	Mitocondrias aisladas de cerebro completo	(Bhagwat y col. 1995)
	Etanol agudo i.p. (0.8 ml/ kg)	Lóbulo olfatorio, mesencéfalo, hipocampo, hipotálamo, cerebelo	(Yadav y col. 2006)
	Etanol (25 mM, durante 48 h)	Cultivos celulares neuronales (x1.7) y cultivos celulares gliales (x1.25)	(Kapoor y col. 2006)
Inmunocitoquímica			
	Etanol 2% (v/v) en solución con sacarosa 1% (3 días). Etanol elevado al 5% (1 semana). Etanol elevado al 10% (30 días)	Corteza, hipocampo (células piramidales), ganglio basal (caudado putamen, globo pálido, NAc), núcleos hipotalámico y reticular	(Anandatheerthavarada y col. 1993)
	Dieta líquida de Lieber y DeCarli (3 semanas)	Ganglio basal, substantia nigra e hipocampo	(Sohda y col. 1993)
	Etanol (25 mM durante 14 días) en cultivos medios de astrocitos	Cultivos primarios de astrocitos (46% de incremento)	(Montoliu y col. 1995)
	Etanol intragástrico (3g/ kg/ día, durante 7 días)	Estriado (Caudado putamen, moderado) Corteza frontal, tubérculo olfatorio, corteza piriforme (moderado) Hipocampo (elevado en giro dentado y células piramidales) Cerebelo (capa celular granular y molecular)	(Howard y col. 2003)

Etanol (25 mM, durante 48h)	Cultivos celulares neuronales (58% de incremento) y cultivos celulares gliales (47% de incremento)	(Kapoor y col. 2006)
RT-PCR (niveles de mRNA)		
Etanol (25 mM, durante 48h)	Cultivos celulares neuronales (x1.89) y cultivos celulares gliales (x1.66)	(Kapoor y col. 2006)
Etanol agudo i.p. (0.8 ml/kg)	Hipotálamo, hipocampo y cerebelo	(Yadav y col. 2006)

(1) Entre paréntesis se indica la magnitud de la inducción enzimática (Factor, x, o porcentaje de incremento, %) cuando está disponible.

(2) CZN-h: hidroxilación de la clorzoxazona.

(3) NMDA – d: demetilación de la N – nitrosodimetilamina.

1.2. PAPEL DEL ACETALDEHÍDO EN LOS EFECTOS COMPORTAMENTALES DEL ETANOL

Durante décadas la implicación del acetaldehído en el desarrollo de parte de los efectos del etanol sobre ciertos comportamientos de los animales de experimentación ha sido un tema de profundo debate en la comunidad científica. Sin embargo, en los últimos años diversos grupos de investigación han demostrado claramente no sólo que este metabolito es psicofarmacológicamente activo a nivel central, sino que su génesis es necesaria para que el etanol manifieste algunos de sus efectos sobre el comportamiento.

Numerosos estudios muestran que el acetaldehído, inyectado directamente en el cerebro de roedores, es capaz de provocar respuestas comportamentales similares a las producidas por el etanol, incluyendo estimulación motora (Correa y col. 2003a; Arizzi-LaFrance y col. 2006; Correa y col. 2009a), auto-administración (Brown y col. 1980; Myers y col. 1982; Rodd-Henricks y col. 2002), condicionamiento de preferencia de lugar (Smith y col. 1984; Quertemont y De Witte. 2001; Quintanilla y col. 2002) y aversión condicionada al gusto (Brown y col. 1978; Aragón y col. 1986). De todos estos estudios quisiéramos destacar dos, por su relevancia en el contexto que nos ocupa. El primero fue publicado en 2003 por Correa y col. (Correa y col. 2003a), y en él, los autores demostraron que la administración intracerebroventricular de acetaldehído producía una clara activación locomotora, originando curvas dosis-respuesta muy similares a las obtenidas para el etanol. El segundo estudio que queremos destacar fue publicado en 2006 por Arizzi y col. (Arizzi-LaFrance y col. 2006) y en él se identificaba, por primera vez, una región cerebral, la *substantia nigra pars reticulata* (SNpr), en la que tanto el acetaldehído como el etanol desencadenaban respuestas motoras similares, tras la administración de dosis del mismo orden.

Recientemente, también se ha demostrado que las microinyecciones de acetaldehído en el núcleo arqueado del hipotálamo (NArc) aumentan la

actividad locomotora de los animales (Correa y col. 2009a), al igual que hace el etanol (Pastor y Aragón. 2008).

Como vemos la administración de acetaldehído es capaz de desencadenar determinados efectos comportamentales, análogos a los producidos por el etanol. No obstante, este tipo de evidencias, aún siendo importantes, no demuestran que el acetaldehído sea un elemento necesario para la aparición de estos efectos tras la administración de alcohol. Para ello, es necesario un enfoque diferente. Por ejemplo, el uso de una estrategia experimental que permita el bloqueo (o la reducción significativa) de la formación del acetaldehído tras la administración del etanol y analice la aparición, o no, de los efectos comportamentales de la droga, puede ser mucho más adecuada. Otra aproximación alternativa podría consistir en el secuestro o inactivación del acetaldehído formado tras la administración del etanol y la comprobación posterior de la aparición, o no, de los efectos propios del etanol. Esta alternativa, puede, obviamente, ser también muy útil. Como se mostrará a continuación, ambas estrategias han sido empleadas por distintos grupos de investigación y los resultados parecen confirmar que el acetaldehído es un elemento **necesario** para desencadenar la activación motora producida por el etanol.

1.2.1. Efectos del etanol sobre el comportamiento y su modulación mediante la manipulación de su metabolismo cerebral.

Antes de pasar a revisar este importante conjunto de evidencias experimentales, convendría tener en cuenta algunas consideraciones metodológicas relativas a la especie animal y vía de administración empleadas en este tipo de estudios.

Los efectos del etanol sobre la actividad locomotora de los animales de laboratorio dependen fundamentalmente de la especie animal en cuestión, así como de la vía de administración. Los roedores, ratones y ratas, de distintas cepas han sido las especies mayoritariamente empleadas. Generalmente, las

administraciones sistémicas de etanol han sido ampliamente usadas en los estudios desarrollados con ratones. El etanol administrado sistémicamente genera efectos estimulantes locomotores en la mayoría de estirpes de **ratón**, excepto en algunas como por ejemplo los C57/BL6 (Correa y col. 2004b). Por el contrario, las administraciones sistémicas de etanol (i.p.) dan lugar, por lo general, a depresión motora en la mayoría de estirpes de **rata** (Duncan y Cook. 1981; Aragón y col. 1989; Moore y col. 1993; Gingras y Cools. 1996; Correa y col. 2003b; Sanchís-Segura y col. 2005a; Chuck y col. 2006), incluso fenómenos de pérdida de reflejos posturales y sedación cuando las dosis administradas son elevadas (> 2-3 g/ kg) (Paez y Myers. 1990; Webb y col. 2002). Hay que señalar, sin embargo, que existen algunos estudios que demuestran que la administración sistémica puede dar lugar a estimulación motora en determinadas estirpes de rata. Este hecho se ha demostrado, por ejemplo, en ratas alcohol-preferentes tras el consumo voluntario de etanol (Paivarinta y Korpi. 1993; Colombo y col. 1998) o tras la administración i.p. de etanol (Waller y col. 1986; Rodd y col. 2004), así como en crías de Sprague-Dawley tras la administración intragástrica de etanol (Pautassi y col. 2011).

Por otra parte, las **administraciones intracerebrales** de etanol producen estimulación en **ratas**. Correa y col. demostraron que la administración intracerebroventricular de etanol a dosis pequeñas o moderadas es capaz de estimular la actividad motora en ratas (Correa y col. 2003a; Correa y col. 2003b). Este efecto es dosis-dependiente y la curva dosis-respuesta muestra un perfil de “U” invertida. Pero también la administración localizada en determinadas regiones del encéfalo es capaz de desencadenar aumentos en la actividad motora. En los últimos años, se han detectado al menos dos regiones cerebrales claramente implicadas en la aparición de los efectos estimulantes motores del etanol. Como indicamos más arriba, en 2006 se señaló a la SNpr como una región en la que el etanol actúa induciendo una clara activación motora en la rata (Arizzi-LaFrance y col. 2006). En esta región cerebral confluyen diferentes sistemas neurotransmisores que interactúan para regular la actividad motora del animal. Además, es una región rica en catalasa, en la que el etanol, tras su administración localizada, podría convertirse en acetaldehído.

Otra zona implicada en la mediación de las propiedades estimulantes del etanol es, como dijimos, el NARc, en el cual el etanol puede actuar de modo dosis dependiente para producir también una clara activación motora en las ratas (Pastor y Aragón. 2008). De hecho, algunos autores postulan que es una estructura necesaria para que el etanol desencadene la estimulación motora, puesto que las lesiones neurotóxicas de esta región previenen los efectos del etanol (Crabbe y Dorsa. 1986; Sanchís-Segura y Aragón. 2002; Miquel y col. 2003). El NARc se caracteriza por poseer una elevada actividad catalasa, pero también por presentar neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC), el precursor de síntesis de las β -endorfina, que como veremos más adelante, también ha sido implicado en la génesis de algunos de los efectos neurobiológicos del etanol.

A pesar de la importancia de los hallazgos antes comentados, es curioso constatar que hasta la fecha no se haya abordado la realización de este mismo tipo de experimentos en un área cerebral clave en el desarrollo y manifestación de los trastornos adictivos como es el VTA. Como veremos más adelante, éste ha sido uno de nuestros objetivos.

Hechas estas matizaciones metodológicas previas, pasaremos a continuación a revisar los estudios que demuestran que es necesaria la conversión de etanol en acetaldehído para que el etanol desencadene ciertos cambios en el comportamiento de los animales de experimentación.

Como dijimos, la manipulación de la actividad (tanto el bloqueo como la promoción) de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo cerebral del etanol ha sido la estrategia más ampliamente empleada para demostrar la implicación del acetaldehído en la génesis de alguno de los efectos comportamentales del etanol. Dada su importancia en el metabolismo cerebral del alcohol, la manipulación de actividad de la catalasa ha sido la estrategia mayoritariamente empleada, aunque no la única. En la tabla 1.2 se muestra, a modo de resumen, los resultados publicados en los últimos años sobre la influencia de los cambios de la actividad catalasa en los efectos comportamentales del etanol. El grupo dirigido por el Profesor CMG Aragón ha desarrollado numerosos estudios en los que se demuestra que los cambios en

la actividad de la catalasa permiten modular algunos de los efectos comportamentales desencadenados por el etanol, más concretamente, los efectos sobre la **actividad locomotora de roedores**.

Como se desprende de la observación de la tabla, los tratamientos que **reducen la actividad de la catalasa**, atenúan el efecto depresor motor inducido por la administración i.p. de etanol en ratas (Aragón y col. 1989). Así, la administración sistémica de aminotriazol bloquea el efecto depresor motor de la inyección i.p. de etanol (2g /kg) en ratas Long Evans. Además, la administración intracerebral de este inhibidor es capaz de bloquear la depresión motora inducida por la administración i.p. de etanol en ratas Sprague-Dawley (Sanchís-Segura y col. 2005a). En el caso de los ratones, los inhibidores de la catalasa (aminotriazol, azida sódica y cianamida administrados i.p. de modo agudo), son capaces de bloquear, de modo dosis-dependiente, la estimulación locomotora generada tras la administración sistémica de etanol (Sanchís-Segura y col. 1999a; Escarabajal y col. 2000; Escarabajal y Aragón. 2002b). La pre-exposición crónica a acetato de plomo (que, recordemos, es capaz de reducir la actividad de la catalasa) disminuye significativamente los efectos estimulantes de la administración i.p. de etanol en ratones (Correa y col. 1999a).

Por otro lado, también se ha comprobado que, en ratas, la administración i.p. de azida sódica (que disminuyó hasta en un 40% la actividad de la catalasa cerebral) previene la estimulación locomotora inducida por la administración intranigral (concretamente en SNpr) de etanol (Arizzi-LaFrance y col. 2006). Del mismo modo, la administración de aminotriazol es capaz de bloquear los efectos estimulantes motores derivados de la administración de etanol en el NArc del hipotálamo de ratas (Pastor y Aragón. 2008).

Otra estrategia alternativa a la inhibición farmacológica de los sistemas enzimáticos que procesan el etanol en el cerebro ha sido el empleo de ratones manipulados genéticamente para afectar la actividad de algunos sistemas metabolizadores de etanol. Así, ratones acatalasémicos muestran una menor activación locomotora a pequeñas y moderadas dosis de etanol por vía sistémica, en comparación con los ratones normales (Aragón y Amit. 1993). Sin

embargo, la administración aguda i.p. de etanol en ratones KO (Knockout) para CYP2E1 incrementa la locomoción de un modo similar a la observada en los respectivos WT (Wild-type). La falta de diferencias entre ambas estirpes ha sido explicada por el hecho de que los ratones KO poseen una mayor expresión (Correa y col. 2009b) y actividad catalasa (Vasiliou y col. 2006), probablemente debida al desarrollo de mecanismos compensatorios desencadenados por la falta de CYP2E1. Curiosamente, la sensibilización locomotora inducida por etanol es similar en WT y KO, lo cual también sugiere una mayor participación de la catalasa en los ratones KO. Además, se ha de tener en cuenta que la actividad de la catalasa se ha correlacionado directamente con el desarrollo de sensibilización locomotora en ratones (Correa y col. 2004b).

Si la reducción de la actividad del metabolismo del etanol conduce a una disminución de los efectos del etanol sobre algunos comportamientos, la situación contraria, es decir, la promoción de la actividad debería conducir a su aumento. Algunos estudios demuestran que el **incremento de la actividad de la catalasa** incrementa los efectos estimulantes motores del etanol (Tabla 1.2). Así, la administración aguda de acetato de plomo o la administración crónica de cianamida, actuaciones ambas que producen un aumento en la actividad catalítica de la catalasa, se traducen en una potenciación de los efectos estimulantes motores del etanol, tras la administración i.p. en ratones Swiss (Correa y col. 1999b; Sanchís-Segura y col. 1999b; Correa y col. 2004b; Correa y col. 2005). Existen otras sustancias, como el ácido 3-nitropropiónico, que incrementan la actividad de la catalasa, y que conducen también a un aumento de los efectos psicoestimulantes del etanol en ratones (Manrique y col. 2006a). Otra metodología empleada para promocionar la actividad de la catalasa, ha sido el incremento de los niveles de H₂O₂ mediante hiperoxia normobárica. Esta aproximación también se ha traducido en un aumento de la respuesta motora al etanol tras la administración i.p. del mismo en ratones (Pastor y col. 2002).

Además de afectar la actividad motora de los animales de experimentación, el etanol es capaz de inducir otras respuestas comportamentales tras su administración, para las cuales se ha sugerido también una clara implicación del acetaldehído empleando las mismas estrategias antes mostradas. Como en el caso de la actividad motora, los estudios que analizaron la implicación del acetaldehído en estas respuestas se basaron en la manipulación fundamentalmente de la actividad de la catalasa (Tabla 1.2), con la posible excepción del análisis del consumo voluntario de etanol, en relación al cual, se han desarrollado estudios relevantes que han manipulado tanto la aldehído deshidrogenasa (ALDH) como la ADH.

Como ocurría con la actividad motora, el pretratamiento con inhibidores de la catalasa, como el aminotriazol, puede modular la aversión condicionada al gusto inducida por etanol en ratas, aunque existen datos dispares en cuanto a su efecto (Aragón y col. 1985a; Redila y col. 2000; Quertemont. 2003). Por otra parte, el aminotriazol atenúa la narcosis y letalidad (Aragón y col. 1991a) producidas por el etanol, así como el consumo voluntario de etanol en ratas (Aragón y Amit. 1992; Rotzinger y col. 1994; Tampier y col. 1994). Sin embargo, el estudio de la influencia que las manipulaciones enzimáticas de la catalasa ejercen en el consumo voluntario de etanol en ratones ha dado lugar a resultados dispares: mientras que algunos autores observan que el aminotriazol reduce el consumo (Koechling y Amit. 1994), otros postulan que la administración aguda de acetato de plomo (que incrementa la actividad catalasa) reduce también la ingesta (Correa y col. 2004a). Curiosamente, la correlación entre la actividad catalasa y la ingesta de etanol parece ser diferente en ratas y ratones, siendo directa (Aragón y col. 1985b; Amit y Aragón. 1988) e indirectamente proporcional (Gill y col. 1996; Correa y col. 2004b), respectivamente. Por otro lado, los ratones KO para CYP2E1, los cuales presentan una actividad catalasa elevada, poseen una menor preferencia por la ingesta de pequeñas concentraciones de etanol frente a los ratones WT, aunque no muestran diferencias cuando se trata de ingerir soluciones de elevada concentración de etanol (Correa y col. 2009b).

El aminotriazol puede, igualmente, incrementar la duración de la pérdida de reflejo postural en ratones tras la administración i.p. de etanol, lo mismo que

hace la administración de acetato de plomo de modo crónico, mientras que el acetato de plomo administrado de forma aguda disminuye la duración de este efecto (Correa y col. 2001; Correa y col. 2005). Otros estudios muestran que la administración i.p aguda de azida sódica o de aminotriazol es capaz de reducir los efectos ansiolíticos generados por la administración sistémica de etanol en ratones (Correa y col. 2008), así como de bloquear el incremento de la memoria social potenciado por el etanol (Manrique y col. 2005). Muy interesante es, también, la demostración de que el aminotriazol es capaz de bloquear el establecimiento del condicionamiento de preferencia de lugar inducido por etanol sistémico en ratones (Font y col. 2008).

Tabla 1.2: Modulación de la actividad catalasa sobre los efectos comportamentales del etanol.

INHIBICIÓN DE LA CATALASA					
Agente farmacológico	Animal	Comportamiento	Efectos del etanol sobre el comportamiento	Efectos del etanol + agente farmacológico	Ref.
Aminotriazol					
	Rata (Long Evans)	Actividad locomotora	Efecto depresor (Vía i.p.)	Bloqueo	(Aragón y col. 1989)
	Rata (Sprague-Dawley)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía intra-NArc)	Bloqueo	(Pastor y Aragón. 2008)
	Ratón	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Bloqueo	(Escarabajal y col. 2000)
	Rata (Long Evans)	Narcosis	Efecto narcótico (Vía i.p.)	Disminución de la duración del efecto.	(Aragón y col. 1991a; Tampier y Quintanilla. 1991)
	Rata (Long Evans)	Letalidad	Efecto letal (Vía i.p.)	Reducción de la letalidad a altas dosis de etanol	(Aragón y col. 1991a)
	Rata (Long Evans)	Hipotermia	Efecto hipotérmico (Vía i.p.)	No tiene efecto	(Aragón y col. 1991a; Tampier y Quintanilla. 1991)
	Rata (Long Evans)	Aversión condicionada al gusto (CTA)	Inducción (Vía i.p.)	Atenuación	(Aragón y col. 1985a)
	Rata (Wistar)	Aversión condicionada al gusto (CTA)	Inducción (Vía i.p.)	Incremento de modo dosis-dependiente	(Quertemont y col. 2003)
	Rata (Long Evans)	Aversión condicionada al gusto (CTA)	Inducción (Vía i.p.)	No tiene efecto	(Redila y col. 2000)
	Rata	Ingesta	Consumo voluntario de etanol	Atenuación de la adquisición (cambios en la palatabilidad)	(Rotzinger y col. 1994)
	Rata (Long Evans)	Ingesta	Consumo voluntario de etanol	Disminución	(Aragón y Amit. 1992)
	Ratón (Swiss)	Ingesta	Consumo voluntario de etanol	Disminución	(Koechling y Amit. 1994)
	Ratón (Swiss)	Memoria social (test de reconocimiento o social)	Incremento (Vía i.p.)	Bloqueo del incremento	(Manrique y col. 2005)
	Ratón (Swiss)	Preferencia de lugar	Condicionamiento (Vía i.p.)	Bloqueo	(Font y col. 2008)
	Ratón (Swiss)	Reflejo postural	Pérdida (Vía i.p.)	Incrementa la duración	(Correa y col. 2001)
	Ratón (CD1)	Ansiedad	Efectos ansiolíticos (Vía i.p.)	Disminución	(Correa y col. 2008)

Azida sódica					
	Rata (Sprague-Dawley)	Actividad locomotora	Efecto depresor (Vía i.p.)	Bloqueo *Administración intra-NArc de la azida sódica	(Sanchís-Segura y col. 2005a)
	Rata (Sprague-Dawley)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía intranigral)	Bloqueo	(Chuck y col. 2006)
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Bloqueo	(Sanchís-Segura y col. 1999a)
	Ratón (Swiss)	Memoria social (test de reconocimiento social)	Incremento (Vía i.p.)	Bloqueo del incremento	(Manrique y col. 2005)
	Ratón (CD1)	Ansiedad	Efectos ansiolíticos (Vía i.p.)	Disminución	(Correa y col. 2008)
Acetato de plomo crónico					
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Bloqueo	(Correa y col. 1999a)
	Ratón (Swiss)	Reflejo postural	Pérdida (Vía i.p.)	Incrementa la duración	(Correa y col. 2001)
Acatalasemia					
	Ratones KO	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.) (WT)	Menor estimulación	(Aragón y Amit. 1993)
	Ratones KO	Narcosis	Efecto narcótico (Vía i.p.) (WT)	Menor duración del efecto	(Aragón y Amit. 1993)
	Ratones KO	Ingesta	Consumo voluntario de etanol (WT)	Mayor consumo	(Aragón y Amit. 1993)
Cianamida aguda					
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Bloqueo	(Escarabajal y Aragón. 2002b)
INCREMENTO DE LA CATALASA					
Agente farmacológico	Animal	Comportamiento	Efectos del etanol sobre el comportamiento	Efectos del etanol + agente farmacológico	Ref.
Acetato de plomo agudo					
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Mayor estimulación	(Correa y col. 1999b; Correa y col. 2000; Correa y col. 2005)
	Ratón (C57)	Ingesta	Consumo voluntario de etanol	Disminución	(Correa y col. 2004b)
	Ratón (Swiss)	Reflejo postural	Pérdida (Vía i.p.)	Disminución de la duración	(Correa y col. 2001; Correa y col. 2005)
Exposición hiperoxia					
	Ratón (CD1)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Mayor estimulación	(Pastor y col. 2002)

Cianamida crónica					
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Mayor estimulación	(Sanchís- Segura y col. 1999b)
Ácido 3-nitropropiónico					
	Ratón (Swiss)	Actividad locomotora	Efecto estimulante (Vía i.p.)	Mayor estimulación	(Manrique y col. 2006a)

1.2.2. Secuestro o inactivación del acetaldehído y modulación de los efectos del etanol sobre el comportamiento

La estrategia alternativa para demostrar la implicación del acetaldehído en el desarrollo de los efectos psicoactivos del etanol, emplea los llamados **agentes secuestrantes** del acetaldehído. Con el manejo de estas sustancias se pretende “inactivar”, desde el punto de vista farmacológico, el acetaldehído que haya podido generarse tras el metabolismo del etanol. Se han usado, para tal fin, dos aminoácidos azufrados: la D-penicilamina (DP) y la L-cisteína. Estos compuestos interactúan con el acetaldehído para formar aductos estables e inactivos (Nagasawa y col. 1980; Kera y col. 1985), que han podido detectarse, para el caso de la D-penicilamina, en plasma, hígado y cerebro de rata tras la administración de etanol (Serrano y col. 2007).

Font y col. (Font y col. 2005) demostraron que el pretratamiento i.p. con D-penicilamina es capaz de reducir de modo dosis-dependiente la estimulación motora generada por la administración i.p. de etanol en ratones, sin afectar a la estimulación generada por la cocaína o la cafeína.

El pretratamiento i.p. con D-penicilamina también atenúa los efectos ansiolíticos (Correa y col. 2008) y el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar generado por la administración i.p. de etanol en ratones (Font y col. 2006b). Del mismo modo, previene el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar en ratas generado por la administración intragástrica de etanol (Peana y col. 2008). Además, este agente secuestrante es capaz de producir una disminución del consumo voluntario de etanol en ratas Long Evans cuando es administrado intracerebroventricularmente (Font y col. 2006a). Queremos destacar igualmente, aunque no se trate de una respuesta comportamental, que la D-penicilamina (i.p.), es capaz de prevenir el incremento que se produce en la liberación de dopamina en NAc Shell tras la administración intragástrica de etanol en ratas (Enrico y col. 2009).

El otro secuestrante empleado en este tipo de estudios, la L-cisteína, también es capaz de prevenir el desarrollo del condicionamiento de preferencia de lugar y el incremento de los niveles de dopamina en NAc Shell, consecutivos a la administración intragástrica de etanol, cuando se administra intraperitonealmente (Peana y col. 2009; Sirca y col. 2011). Además, también se ha demostrado que la L-cisteína, administrada i.p. es capaz de reducir la auto-administración de etanol y el comportamiento de reinicio a la ingesta de etanol en ratas (Peana y col. 2010).

Sin embargo, el pretratamiento i.p. con L-cisteína parece ejercer un efecto no preventivo en lo relativo a las respuestas motoras, ya que este compuesto es capaz de incrementar el efecto estimulante motor inducido por la administración i.p. en ratones (Escarabajal y col. 2001). Una posible explicación a estos hallazgos contradictorios podría encontrarse en la diferente estabilidad de los aductos generados, ya que de ello depende el éxito de la estrategia de secuestro del acetaldehído (Nagasawa y col. 1984). De hecho, los autores propusieron que el aducto formado entre el acetaldehído y la L-cisteína, sería inestable, de modo que podría liberar de modo prolongado y diferido en el tiempo el acetaldehído inicialmente secuestrado, pudiendo así mantener los niveles de acetaldehído en el cerebro elevados durante más tiempo, es decir, el aducto podría actuar como una fuente inesperada y no deseada de acetaldehído libre (Nagasawa y col. 1984).

1.3. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA OPIOIDE ENDÓGENO EN LOS EFECTOS ESTIMULANTES MOTORES DEL ETANOL

El sistema opioide endógeno ha sido íntimamente relacionado con los efectos estimulantes motores generados por la administración sistémica de etanol. Numerosos estudios muestran que la administración sistémica de antagonistas no selectivos de los receptores opioides, como la naltrexona (NTX), es capaz de bloquear la activación motora inducida por la **administración intraperitoneal de etanol** en diversas estirpes de ratón (Kiiama y col. 1983;

Camarini y col. 2000; Pastor y col. 2005; Sanchís-Segura y col. 2005b; Pastor y Aragón. 2006). Pastor y col. (Pastor y col. 2005; Pastor y Aragón. 2006) desarrollaron un conjunto de experiencias que intentaban clarificar cuál era la participación de cada uno de los distintos subtipos de receptor opioide en los efectos del etanol. Los autores mostraron que el antagonista de los receptores opioides del subtipo δ , naltrindole, no era capaz de alterar el incremento en la locomoción inducida por la administración sistémica de etanol en ratones, mientras que el bloqueo selectivo del receptor opioide μ sí lo fue, aunque el perfil del bloqueo dependió del subtipo de receptor μ considerado (μ_1 , μ_2 , μ_3). Es interesante también señalar que los ratones deficientes en el receptor opioide de tipo μ poseen una respuesta motora reducida, en relación a la evocada en ratones normales por el etanol administrado periféricamente (Hall y col. 2001). Estos hallazgos parecen apuntar a los receptores opioides de tipo μ como un eslabón necesario en el desarrollo de las respuestas motoras al etanol. Pero, ¿cuál es el mecanismo a través del cual estos receptores participan en los efectos motores citados?

Inicialmente, se postuló que el efecto atenuante de algunos antagonistas opiáceos sobre la estimulación asociada al etanol podría deberse a un hipotético efecto de estos agentes sobre el metabolismo del etanol (Badaway y Evans. 1981). Sin embargo, varios estudios posteriores han demostrado que los niveles de etanol, tanto cerebral como plasmático, no se alteran tras la administración de naltrexona, lo que aparentemente descarta un cambio en la eficacia de las rutas biotransformadoras del etanol (Kiiianmaa col. 1983; Pastor y Aragón. 2006).

Otra posibilidad alternativa para explicar cómo los antagonistas opioides previenen la aparición de los efectos del etanol podría ser que el etanol o sus derivados sean capaces de modular la actividad de estos receptores que, hoy sabemos, participan en el control de la actividad de muchos de los sistemas neuronales involucrados en la génesis de esta respuesta motora. Sin embargo, que sepamos no existen datos publicados que muestren que el etanol pueda interaccionar con los receptores opioides.

Un interrogante adicional muy importante que, obviamente, surge al considerar el papel desempeñado por los receptores opioides μ en las respuestas motoras evocadas por la administración de etanol es el siguiente: ¿quién es el responsable de la modulación de la actividad del receptor opioide, el etanol o su metabolito, el acetaldehído?

Curiosamente, ninguno de los autores que ha demostrado la necesidad del acetaldehído en el desarrollo de las respuestas activadoras de la locomoción ha planteado experimentos que intenten analizar si los antagonistas de los receptores opioides son capaces de bloquear los efectos estimulantes del acetaldehído cuando éste se administra directamente en el cerebro. Como veremos, en la presente Tesis hemos planteado algún experimento que trata de responder a esta cuestión.

En la última sección de esta parte introductoria hemos decidido incluir un breve recordatorio de la anatomía funcional del VTA, área cerebral, que por su importancia en el contexto del fenómeno de la adicción, ha constituido el centro de nuestra atención en la mayor parte de los experimentos desarrollados. Este recordatorio, creemos, ayudará a comprender mejor algunos aspectos que aparecerán en secciones posteriores de esta tesis.

1.4. BREVE RECORDATORIO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

El sistema MCLD constituye el sustrato neuroanatómico esencial para el desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Las neuronas DA en este sistema, se originan en el VTA y proyectan a diversas estructuras asociadas con el sistema límbico, destacando en especial, el NAc y la corteza prefrontal (PFC). Estas neuronas se activan directa o indirectamente tanto por las diferentes drogas de abuso, como por los refuerzos naturales (Koob. 2006). La consecuencia inmediata de esta activación es un incremento momentáneo e intenso de los niveles de DA en las distintas regiones de proyección, lo que, como veremos más adelante, ayuda a explicar los cambios en el comportamiento evocados por las drogas de abuso.

La concepción más aceptada hoy día (Ikemoto. 2007) considera que el VTA consta de 4 zonas principales: el núcleo paranigral (PN), el área adyacente al fascículo retroflexo (PFR), el área pigmentada parabraquial (PBP) y la cola del tegmento ventral (VTT). En la Figura 1.2, además de la localización y posición relativa de estas zonas, se observa que tanto la PBP como el PN son zonas ricas en cuerpos neuronales dopaminérgicos, mientras que VTT y PFR presentan un contenido inferior en células DA. Este último dato es importante pues, aunque el VTA ha sido considerado clásicamente como una región eminentemente dopaminérgica, la realidad es que algo menos del 60 % de su población neuronal (en la rata) es dopaminérgica (Swanson. 1982; Margolis y col. 2006b). Este dato contrasta claramente con el correspondiente a la adyacente SNpc en la cual aproximadamente el 90 % de las neuronas son DA (Margolis y col. 2006b). Del aproximadamente 40% de neuronas no DA presentes en el VTA, una gran proporción se corresponde citoquímicamente con neuronas que liberan GABA (neuronas GABA) (Van Bockstaele y Pickel. 1995; Carr y Sesack. 2000; Margolis y col. 2006a) aunque también se han identificado neuronas que liberan glutamato (neuronas Glu) (Chuhma y col. 2004; Lavin y col. 2005).

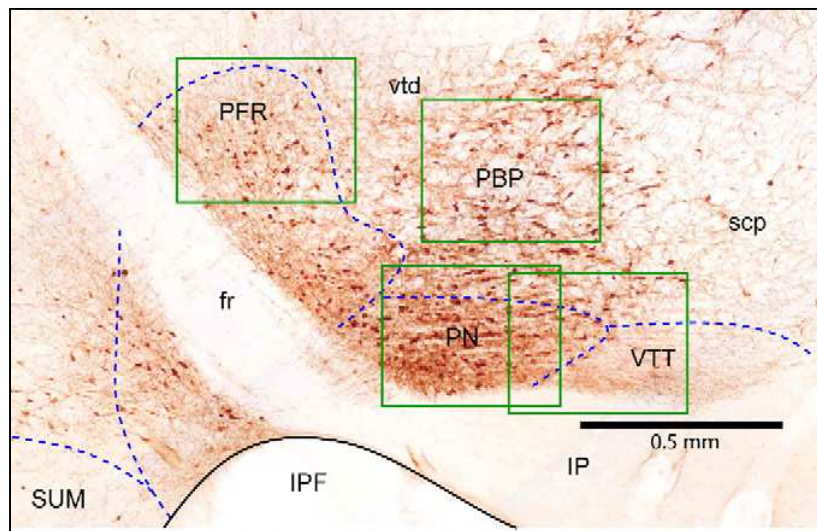


Figura 1.2: Microfotografía ampliada de una sección sagital del cerebro de rata mostrando la localización y posición relativa de las diferentes zonas incluidas en el VTA. La microfotografía pertenece a una sección sagital sujeta a tinción inmunohistoquímica para mostrar las células TH-positivas. Como se aprecia, las regiones PN y PBP presentan una mayor riqueza de neuronas TH positivas. Obsérvese también que las regiones PN y VTT se encuentran en posiciones más ventrales que PBP y PFR. Imagen adaptada de Ikemoto (Ikemoto. 2007).

Abreviaturas: **PN**, núcleo parnigral, **PBP**, área pigmentada parabraquial, **PFR**, área adyacente al fascículo retroflexo, **VTT**, cola del tegmento ventral, **fr**, fascículo retroflexo, **IP**, núcleo interpeduncular, **IPF**, fosa interpeduncular, **SUM**, núcleo supramamilar, **vtd**, decusación supramamilar, **scp**, pedúnculo cerebeloso superior, **PIF**, núcleo parainterfascicular del VTA.

1.4.1. Principales aferencias y eferencias del VTA.

Las principales aferencias y eferencias del VTA se muestran en la Figura 1.3.

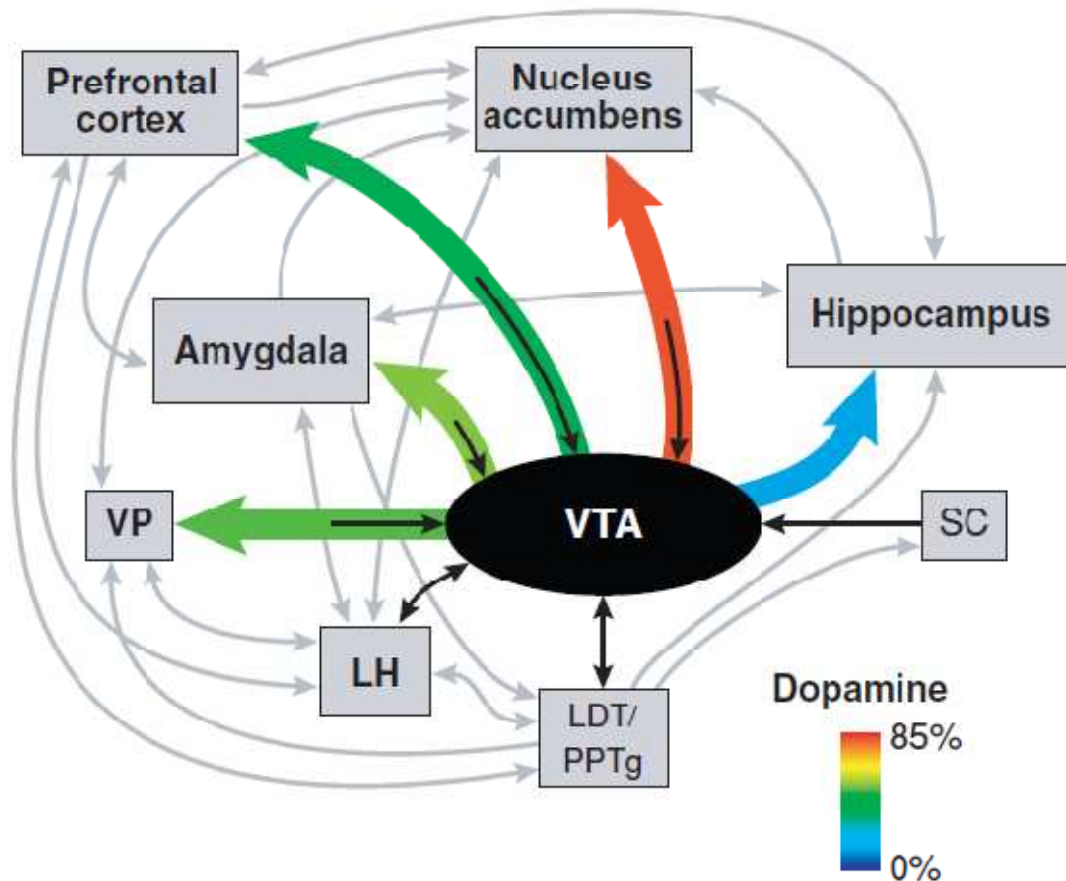


Figura 1.3.: Principales aferencias y eferencias del VTA mostrando en negro o en color las conexiones directas entre el VTA y distintas regiones del cerebro. Las flechas de diferente color indican el porcentaje aproximado de neuronas DA que participan en la proyección (según la escala de colores mostrada abajo a la derecha). Las flechas grises indican otras conexiones relevantes. Las flechas con doble punta indican proyecciones bidireccionales. Figura tomada de Fields y col (Fields y col. 2007).

Abreviaturas: **LDT**, núcleo tegmental laterodorsal, **LH**, hipotálamo lateral, **PPTg**, núcleo tegmental pedunculopontino, **SC**, colículo superior, **VP**, pálido ventral.

Aferencias al VTA

El VTA recibe proyecciones desde múltiples regiones del cerebro (Phillipson. 1979; Geisler y Zahm. 2005). Son especialmente relevantes las **aferencias glutamatérgicas** procedentes de:

- Corteza prefrontal (PFC) (Sesack y Pickel. 1992)
- Hipotálamo lateral (LH) (Rosin y col. 2003)
- Núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (Georges y Aston-Jones. 2002)
- Área tegmental mesopontina (Semba y Fibiger. 1992; Paxinos y Watson. 2007), en concreto:
 - Núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg)
 - Núcleo tegmental laterodorsal (LDT)

Estos dos últimos núcleos reciben además aferencias glutamatérgicas desde la PFC (en especial el LDT) y la amígdala (en especial el PPTg) (Semba y Fibiger. 1992) y aportan no sólo aferencias glutamatérgicas al VTA sino también GABAérgicas y colinérgicas (Cornwall y col. 1990; Semba y Fibiger. 1992; Oakman y col. 1995).

El VTA recibe también **aferencias GABAérgicas** (que expresan al mismo tiempo los péptidos: sustancia P y dinorfina) desde:

- Pálido ventral (VP) (Geisler y Zahm. 2005)
- Núcleo accumbens (NAc) (Conrad y Pfaff. 1976)

Otras proyecciones relevantes, no mostradas en la Figura 1.3, para la funcionalidad del VTA son las **noradrenérgicas** procedentes del *locus coeruleus* y las **serotonérgicas** procedentes de los núcleos dorsales del rafe (Phillipson. 1979; Geisler y Zahm. 2005).

Eferencias del VTA

Las neuronas del VTA envían proyecciones a la totalidad de los territorios desde los que recibe aferencias con la única excepción, tal vez, del colículo superior (SC). Pero, además, envían también proyecciones a otras áreas, como por ejemplo el hipocampo, la corteza entorrinal y el área septal lateral (Beckstead y col. 1979; Swanson. 1982).

Diversos estudios han mostrado que las diferentes áreas-diana reciben las proyecciones desde subgrupos muy concretos de neuronas del VTA y, rara vez, un mismo grupo de neuronas envía su proyección a dos dianas diferentes (Swanson. 1982; Fallon y col. 1984; Margolis y col. 2006b).

Las proyecciones son también de naturaleza neuroquímica variable en función de la diana considerada. La proporción de **neuronas DA** implicadas en la proyección es muy importante cuando la diana es el NAc (65-85%) o el área septal lateral (72%), y algo menor cuando la proyección está dirigida a la amígdala (53%), la corteza entorrinal (46%), la PFC (30%–40%) o al hipocampo (6%–18%) (Swanson. 1982; Fallon y col. 1984; Gasbarri y col. 1994; Margolis y col. 2006a).

Una proporción significativa de las eferencias del VTA dirigidas hacia PFC y NAc parecen ser de naturaleza **GABAérgica** (Van Bockstaele y Pickel. 1995; Carr y Sesack. 2000; Margolis y col. 2006a). También existen pruebas que sugieren la existencia de proyecciones **glutamatérgicas** que tienen por destino tanto la PFC como el NAc (Chuhma y col. 2004; Lavin y col. 2005).

Como se ha indicado, las neuronas en el VTA se estructuran en diferentes subpoblaciones en función de la diana de proyección y del contenido en neurotransmisor. Así, las entradas glutamatérgicas procedentes de PFC y del LH contactan con neuronas DA que, a su vez, proyectan de nuevo hacia la PFC, pero, curiosamente, no establecen conexiones con neuronas DA que envían sus axones hacia el NAc. Por otra parte, las proyecciones glutamatérgicas del PFC que establecen contactos sinápticos con neuronas GABA del VTA, lo hacen con neuronas que envían sus proyecciones hacia el

NAc, no con las que envían sus axones hacia el PFC (Carr y Sesack. 2000; Omelchenko y Sesack. 2005; Balcita-Pedicino y Sesack. 2005; Omelchenko y Sesack. 2006).

Por su parte, las proyecciones procedentes del LDT (tanto excitatorias como inhibitorias) establecen sinapsis tanto con neuronas DA como GABA del VTA que envían sus axones a la PFC (Omelchenko y Sesack. 2005). Sin embargo sólo las neuronas DA que proyectan a NAc reciben un input excitatorio (probablemente colinérgico) desde LDT y sólo las neuronas GABA de VTA que proyectan hacia NAc reciben una entrada inhibitoria GABAérgica desde el LDT.

1.4.2. Influencias locales en la actividad de las neuronas VTA

Existen interneuronas GABA en el VTA que establecen contactos inhibitorios a nivel local con otras neuronas del VTA incluyendo lógicamente las neuronas DA. Fue en 1992 cuando Johnson y North (Johnson y North. 1992b) sugirieron que podría tratarse de interneuronas GABA con actividad espontánea que, además, expresaban el receptor opioide del subtipo μ . Es decir, la propuesta de estos autores asumía la existencia de una población local de neuronas GABA capaz de ejercer un control inhibitorio tónico sobre la actividad de las neuronas DA. Más recientemente, Steffensen y col (Steffensen y col. 2006) corroboraron la existencia de esta población neuronal en VTA susceptible de ser inhibida por la administración local y sistémica de agonistas del receptor opioide μ , aunque matizaron su naturaleza exclusivamente local: más que de interneuronas se trataría de neuronas GABA de proyección que enviarían colaterales a nivel local sobre las neuronas DA de VTA. En la Figura 1.4 se ilustra la conexión entre las neuronas DA y GABA de VTA.

Además de este control local inhibitorio por parte del GABA, la propia dopamina, liberada de modo somatodendrítico, es capaz de hiperpolarizar, a través de receptores D_2 , no sólo a las neuronas DA sino también a las no DA del VTA (Johnson y North. 1992a; Margolis y col. 2006b).

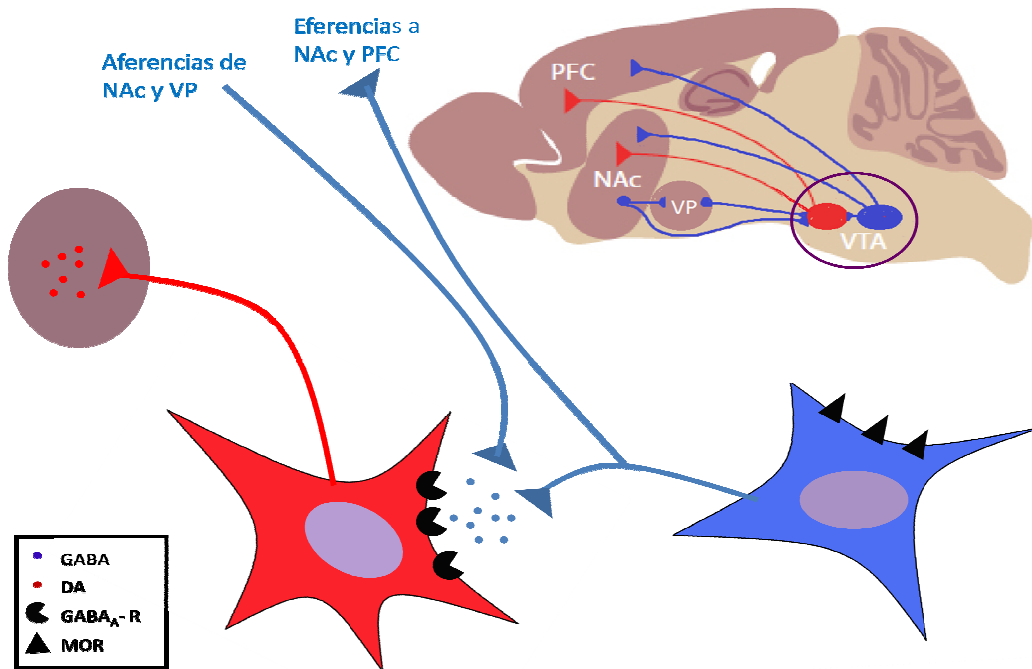


Figura 1.4: Visión esquemática de la conexión neuronas DA - GABA en VTA. Las neuronas DA (rojo) están reguladas bajo control inhibitorio tónico por las neuronas GABA (azul), bien por las aferencias GABAérgicas procedentes de NAc y VP como de las propias neuronas GABA localizadas en VTA. Estas neuronas GABA expresan receptores opioides de tipo μ (MOR) en el soma y el área dendrítica, que con su activación hiperpolarizan la neurona GABA, inhibiendo la liberación de GABA, y consecuentemente impidiendo parte del control inhibitorio sobre la neurona DA.

Abreviaturas: **DA**, neurona DA, **GABA**, neurona GABA, **$GABA_A$ -R**, receptor $GABA_A$, **PFC**, corteza prefrontal, **MOR**, receptor opioide de tipo μ , **NAc**, núcleo accumbens, **VP**, pálido ventral, **VTA**, área tegmental ventral,

1.4.3. Organización de la proyección dopaminérgica VTA → estriado ventral: localización de los cuerpos celulares en función de las áreas de proyección.

Sin duda alguna, de entre todas las proyecciones que emanan del VTA, la proyección dopaminérgica VTA → estriado ventral ha sido la más estudiada. Estos estudios consideran que el estriado ventral comprende tanto el NAc como el tubérculo olfatorio. Fruto de estos estudios, hoy se conoce de un modo muy detallado la organización topográfica de esta vía.

Como se indicó anteriormente, la mayoría (entre el 65 y el 85%) de las neuronas que proyectan desde el VTA hacia el NAc son de naturaleza dopaminérgica. Sin embargo, es importante resaltar que no todas las zonas del VTA proyectan hacia el estriado ventral. Como veremos a continuación, se puede afirmar que las neuronas DA que envían eferencias hacia el estriado ventral se distribuyen en el VTA según una topografía posteromedio- anterolateral que mantiene un ángulo aproximado de 45° con respecto a la línea media del cerebro. En la Figura 1.5. se ilustra claramente la topografía de las proyección dopaminérgica VTA → estriado ventral. El **estriado ventral lateral** (tubérculo olfatorio lateral, NAc shell lateral y NAc core) recibe su inervación dopaminérgica desde las porciones laterales del VTA (anteriores y posteriores) (tonalidades amarilla y verdes), mientras que el conjunto del **estriado ventral medial** (tubérculo olfatorio medial y NAc shell medial) recibe inervación dopaminérgica desde la zona posteromedial del VTA (tonalidades roja y granate). Centrando la atención en las distintas estructuras del VTA se puede apreciar que: a) la zona medial del PBP y el PN proyectan selectivamente hacia la zona medial del estriado ventral y b) las zonas laterales del PBP lo hacen sobre regiones laterales del estriado ventral. Por otra parte, el estriado ventral medial, también recibe axones procedentes de zonas mediales próximas, como el núcleo interfascicular (IF) y el núcleo central lineal (CL). Este hecho ha llevado a autores como Ikemoto (Ikemoto. 2007) a considerar el CL y el IF parte integrante del llamado, **circuito dopaminérgico meso-estriatal ventromedial** (tonalidades roja y granate) que media desde el punto de vista

funcional aspectos cruciales del refuerzo. Este circuito incluye la zona posteromedial del VTA, que proyecta al NAc shell medial y al tubérculo olfatorio medial.

En concreto, esta organización de las proyecciones dopaminérgicas permite explicar las diferencias observadas en cuanto al patrón de auto-administración de diversas drogas. Así, las ratas aprenden a auto-administrarse en VTA posterior (VTAp), pero no en VTA anterior (VTAA), sustancias como la nicotina (Ikemoto y col. 2006), carbacol (Ikemoto y Wise. 2002), opiáceos (Zangen y col. 2002), cannabinoides (Zangen y col. 2006), cocaína (Rodd y col. 2005), etanol (Rodd-Henricks y col. 2000), su metabolito acetaldehído (Rodd-Henricks y col. 2002) y su derivado metabólico salsolinol (Sal) (Rodd y col. 2008). Estas evidencias parecen indicar que es el VTAp, y no el VTAA, el que está relacionado con los fenómenos de refuerzo. Cabe resaltar además que no sólo las proyecciones emitidas desde el VTAp hacia NAc shell son las involucradas en los fenómenos recompensantes, aunque sí parecen ser las principales. Además, las ratas también aprenden a auto-administrarse nicotina y muscimol (agonista GABA_A) en el CL (Ikemoto y Goeders. 1998; Ikemoto y col. 2006), al igual que los psicoestimulantes actúan como reforzantes en el IF (Ikemoto. 2007).

Por el contrario, las zonas PFR y VTT del VTA apenas envían aferencias dopaminérgicas al estriado ventral. VTT parece ser un conglomerado de neuronas GABA (Olson y Nestler. 2007). Por otro lado, PFR parece enviar sus proyecciones junto con las procedentes del área hipotalámica posterior (PHA) a los núcleos de la banda diagonal situados ligeramente más caudales al estriado ventral y adyacentes al pálido ventral.

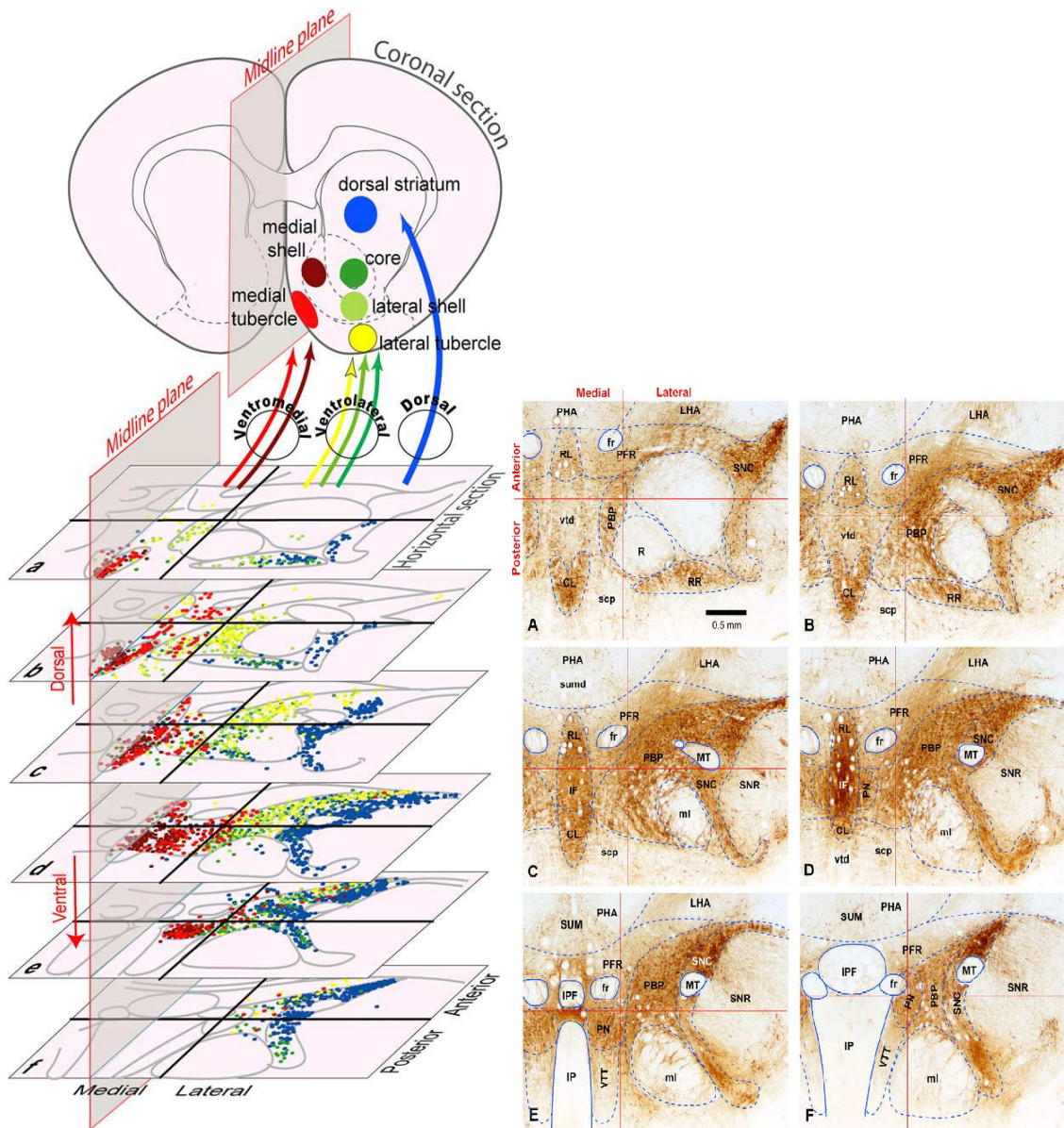


Figura 1.5: Topografía de las proyecciones dopaminérgicas VTA→estriado ventral. Cada uno de los planos horizontales **a-f** del diagrama se corresponde con las microfotografías **A-F** correspondientes a secciones horizontales sometidas a inmunohistoquímica para la TH. Adaptado de Ikemoto (Ikemoto. 2007).

Abreviaturas: **CL**, núcleo central lineal, **fr**, fascículo retroflexo, **IF**, núcleo interfascicular, **IP**, núcleo interpeduncular, **IPF**, fosa interpeduncular, **LHA**, área hipotalámica lateral, **ml**, lemnisco medial, **MT**, núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio, **PBP**, área pigmentada parabraquial, **PFR**, área adyacente al fascículo retroflexo, **PHA**, área hipotalámica posterior, **PN**, núcleo paranigral, **R**, núcleo rojo, **RL**, núcleo rostral lineal del rafe, **RR**, núcleo retrorubral, **scp**, pedúnculo superior cerebelar, **SNC**, sustancia nigra compacta, **SNR**, sustancia nigra reticular, **SUM**, núcleo supramamilar, **sumd**, decusación supramamilar, **vtd**, decusación tegmental ventral, **VTT**, cola tegmental ventral.

1.4.4. Neuronas DA del VTA: propiedades electrofisiológicas y función.

Las agrupaciones A8, A9 y A10 de neuronas DA del cerebro muestran, en los estudios electrofisiológicos (realizados primordialmente en ratas y monos), activaciones características tras la presentación de estímulos recompensantes primarios (recompensas) y estímulos predictores de recompensas (estímulos condicionados) (Schultz. 1998). En general, se observa una mayor consistencia (mayor proporción de neuronas y activaciones más intensas) en las activaciones para los grupos neuronales posicionados más medialmente en el cerebro, es decir, para las neuronas A10 (VTA) y las neuronas más mediales de la agrupación A9 (zonas mediales de la SNc). Es importante señalar que la latencia en la aparición de las activaciones y su duración son similares, independientemente de que deriven de la presentación de una recompensa o de un estímulo condicionado.

Las neuronas DA de VTA presentan dos modalidades de actividad eléctrica en preparaciones *in vivo*: (1) una actividad que se ha dado en llamar **tónica**, caracterizada por la presencia de potenciales de acción aislados descargados de un modo no excesivamente regular en el tiempo y a una frecuencia de entre 1 y 5 Hz y (2) una actividad llamada **fásica** que se caracteriza por la descarga de trenes de impulsos, constituidos por entre 2 y 10 potenciales de acción emitidos a una frecuencia de 10-30 Hz, seguidos a menudo por una depresión de la actividad (Grace y Bunney. 1984a; Grace y Bunney. 1984b; Overton y Clark. 1997; Hyland y col. 2002).

La modalidad tónica proporciona, según Venton y col 2003 (Venton y col. 2003), el tono dopaminérgico basal en las áreas de proyección y podría ser necesaria para mantener un estado adecuado de alerta que permita la realización de los comportamientos habituales ya aprendidos (Goto y Grace. 2005; Cagniard y col. 2006; Salamone. 2007).

En animales conscientes, la presentación de recompensas inesperadas o de estímulos predictores de estas recompensas, promueve el cambio de la actividad desde la modalidad tónica a la fásica en el 55-80% de las neuronas

de VTA (Schultz. 1998; Pan y col. 2005). Este cambio se piensa que es el responsable del incremento en los niveles de dopamina en las áreas de proyección y, por tanto, de los correspondientes cambios plásticos que subyacen al aprendizaje tanto de la valencia del estímulo predictivo como del comportamiento más adecuado para la consecución de la recompensa (Arbuthnott y Wickens. 1996; Schultz. 1998; Wickens y col. 2003; Montague y col. 2004; Mahon y col. 2004; Wolf y col. 2004). Además, estos aumentos fásicos de dopamina podrían también actuar, según algunos autores, atrayendo la atención del animal y desencadenando en él un comportamiento motor de exploración y aproximación hacia esos estímulos (Pankseep. 1998; Berridge. 2007; Nicola. 2007). Es por ello que la activación motora se ha tomado como un índice comportamental que indica con bastante precisión la activación fásica de las neuronas DA de VTA (Pankseep. 1998).

La actividad de las neuronas DA de VTA está regulada a través de la interacción de múltiples sistemas. El resultado de estas interacciones es el aumento o disminución de la tasa de disparo de las neuronas DA de VTA. Entre estos sistemas de control destacan las aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas, y el sistema de control constituido por los circuitos locales GABAérgicos.

Diferentes evidencias electrofisiológicas indican que la actividad de las neuronas GABA de VTA es crucial para la regulación de la actividad de las neuronas DA de VTA. Como se ha comentado anteriormente, la actividad de las neuronas GABA está controlada de modo tónico por receptores opioides de tipo μ presentes en el soma y en el área dendrítica de las mismas (Mansour y col. 1995; Garzon y Pickel. 2001; Steffensen y col. 2006). Johnson y North (Johnson y North. 1992b), demostraron que los agonistas de los receptores opioides μ disminuían la frecuencia de los potenciales espontáneos inhibitorios de las neuronas GABA de VTA, es decir, la activación de estos receptores opioides hiperpolariza e inhibe la actividad espontánea de las neuronas GABA, desinhibiendo a su vez a las neuronas DA. Desde este hallazgo, diversos laboratorios han corroborado estas observaciones. Por ejemplo, Xiao y col. (Xiao y col. 2007) observaron que la naloxona (un antagonista selectivo de los receptores opioides) reduce la frecuencia de disparo de las neuronas DA,

mientras que el DAMGO (agonista selectivo de los receptores opioides tipo μ) hiperpolariza y silencia la excitación neuronal de las neuronas GABA de VTA (Steffensen y col. 2006; Xiao y Ye. 2008), lo cual repercute en una desinhibición de las neuronas DA (Spanagel y col. 1992).

Estos hallazgos, como veremos en secciones posteriores, podrían servir para explicar algunos de los resultados que presentaremos en esta Tesis.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es aportar datos que permitan ahondar en el mecanismo de acción del etanol a nivel del sistema MCLD, en especial en el VTA, y discernir si el acetaldehído participa en dichos efectos. Para ello, se han diseñado una serie de experimentos encaminados a:

1. Analizar la expresión y distribución del CYP2E1 en el sistema MCLD, así como su potencial inducción enzimática tras la administración repetida de etanol.
2. Analizar los efectos del etanol y el acetaldehído, su primer metabolito, en VTA sobre el comportamiento locomotor en ratas y la posible implicación del sistema opioide endógeno en estos efectos.
3. Analizar la posible implicación del acetaldehído, generado localmente en el VTA, en los efectos estimulantes motores del etanol mediante el uso de agentes secuestrantes del acetaldehído.
4. Estudiar los efectos motores de la administración repetida de etanol en el VTA, es decir, analizar la potencial aparición de fenómenos de tolerancia y/o sensibilización locomotora.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El animal de experimentación empleado para la realización de este trabajo ha sido la rata albina macho de raza Wistar, con un peso comprendido entre 300 – 320 g.

Todos los animales se criaron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat de València, situado en la Facultat de Farmàcia, y se mantuvieron con una dieta sólida estándar en perfectas condiciones higiénicas y climáticas: temperatura $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad 60% y ciclos de luz/ oscuridad de 12 horas (hora de encendido: 8:00 y apagado: 20:00). Los procedimientos descritos fueron realizados de acuerdo con la directiva EEC 86/609 y el Real Decreto RD 1201/2005, y aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia.

3.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO

3.2.1. Diseño experimental

Con objeto de estudiar la distribución del CYP2E1 en tres áreas del sistema MCLD del cerebro de la rata y su potencial inducción por parte del etanol se usó la técnica de *Western blot*. Concretamente, se planificaron los siguientes experimentos:

- Experimento 1: Determinación de los niveles de expresión basal del CYP2E1 en el sistema MCLD (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata.
- Experimento 2: Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión del CYP2E1 en el sistema MCLD (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata.

Experimento 1. Determinación de los niveles de expresión basal del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata

Para evaluar los niveles de expresión basal del CYP2E1 en NAc, VTA y PFC se utilizaron los cerebros procedentes de un grupo de 6 animales mantenidos en las condiciones habituales en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universitat hasta el momento de su uso. El día del experimento, los animales recibieron una dosis letal de hidrato de cloral, para, seguidamente, ser decapitados y proceder rápidamente a la extracción tanto del cerebro como de un fragmento de hígado. Los cerebros y los fragmentos de hígado se congelaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Para la obtención de las muestras cerebrales procedentes de las regiones de interés, se realizaron cortes coronales del cerebro en un criostato a -14°C hasta visualizar y reconocer con exactitud las zonas del estudio (PFC, NAc y VTA). Una vez localizadas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1986), (Figura 3.1), se cortaron secciones de tamaño adecuado (1 mm aproximadamente de espesor), y las zonas objeto de estudio se extrajeron con ayuda de una punta de micropipeta cortada en el extremo, obteniéndose muestras de 10-20 mg que se depositaron en tubos eppendorf. Las muestras de tejido se mantuvieron en congelación (-20 °C) hasta su procesado.

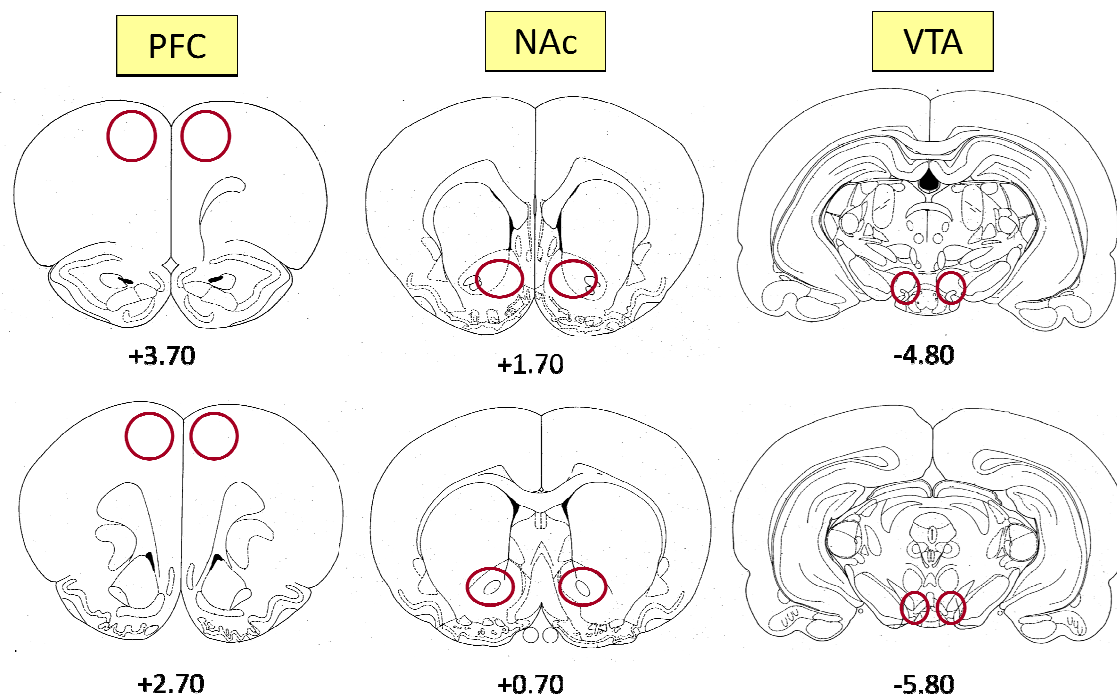


Figura 3.1: Representación gráfica de las diferentes zonas objeto de estudio según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 1986). Los trazados indican aproximadamente el área extraída del tejido, mientras que las coordenadas indican los planos inicial y final de la sección utilizada.

Experimento 2. Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata

En este experimento se analizó la capacidad del etanol para provocar la inducción del CYP2E1, tanto en hígado como en las tres regiones cerebrales analizadas en el experimento anterior.

El tratamiento, basado en el protocolo propuesto por Howard y col. (Howard y col. 2003), consistió en la administración repetida por vía oral de etanol. Las ratas se estabularon individualmente y recibieron una dosis diaria de etanol

(3g/kg, grupo experimental: n= 6) o salino (grupo control: n=6) por vía intragástrica, durante un periodo de 7 días consecutivos. Se ha demostrado que esta dosis de etanol es capaz de producir efectos potentes sobre el sistema nervioso central, incluyendo sedación y descoordinación motora (Le y Israel. 1994).

Tras el tratamiento, se procedió al sacrificio de los animales y obtención de las muestras de tejido. Para ello, 3 horas desde la última administración de etanol, los animales recibieron una dosis letal de hidrato de cloral, y seguidamente fueron decapitados para proceder rápidamente a la extracción del cerebro y de un fragmento de hígado. En el caso de los animales control se procedió del mismo modo. Los cerebros y los fragmentos de hígado fueron congelados a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Las muestras cerebrales procedentes de las regiones de interés se obtuvieron y conservaron tal y como se detalló en el epígrafe anterior.

3.2.2. Determinación de los niveles de CYP2E1 en las muestras biológicas.

Los materiales y procedimientos que se describen a continuación fueron empleados indistintamente para la cuantificación del CYP2E1 en las muestras biológicas procedentes tanto del experimento 1 como del 2.

Materiales y Soluciones de trabajo

Tampón de lisis RIPA (Radio Immune Precipitation Assay)

Este tampón se utilizó como vehículo de los inhibidores de las proteasas para el lisado de las células del tejido y la determinación de la cantidad de proteína

presente en el sobrenadante (ver procedimiento experimental). La composición del mismo fue la siguiente:

Tampón de lisis RIPA	
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	100 mg
Na deoxicolato	500 mg
Igepal CA-630 (Octylphenyl-polyethylene glycol)	1 ml
PBS (Phosphate Buffer Saline)	c.s.p. 100 ml

En el momento de su utilización se le incorporaron los siguientes inhibidores de proteasas (volumen añadido por cada ml de tampón RIPA):

Inhibidores de proteasas	
Leupeptina (4 mM)	10 µl
DTT (dithiothreitol) (1M)	1 µl
Na Ortovanadato (100 mM)	10 µl
Aprotinina (1mg/ml)	10 µl
PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) (100 mM)	10 µl

Tampón de carga

Este tampón se utilizó como vehículo para cargar las muestras en el gel de electroforesis. Se preparó una solución madre concentrada de tampón a pH 6.8 y se congeló en alícuotas de 100 µl. En el momento de su uso se diluyó convenientemente. La composición de la solución concentrada fue la siguiente:

Tampón de carga	
Tris HCl 1M pH 6.8	1.75 ml
Glicerol 100%	1.5 ml
SDS 10%	140 µl
SDS	500 mg
Mercaptoetanol	1.5 ml
Bromofenol	1mg
H ₂ O	110 µl

Tampón de electroforesis

Se elaboró una solución 5 veces más concentrada que se conservó en nevera y, a partir de ésta, se realizaron diluciones en agua a pH 8.3 para ser utilizadas durante la electroforesis. Este tampón se renovó periódicamente. La composición del tampón concentrado (5x) fue la siguiente:

Tampón de electroforesis	
Trizma base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	c.s.p. 1l

Tampón de transferencia

A partir de una solución madre se preparó una dilución para su utilización en la transferencia de las proteínas a la membrana. La solución madre se esterilizó en autoclave en el momento de su preparación. A partir de este tampón madre se elaboró la solución de transferencia. Las composiciones de los mismos fueron las siguientes:

Tampón de transferencia madre		Tampón de transferencia	
Glicina	144 g	Solución madre	100 ml
Trizma base	30 g	Metanol	200 ml
H ₂ O	c.s.p. 1l	H ₂ O	c.s.p. 1l

Solución TBS pH 7.5 (trizma buffer saline)

Esta solución se empleó para lavar las membranas después de cada etapa. La composición de la misma fue:

TBS pH 7.5	
Trizma base	2.4 g
NaCl	29.2 g
H ₂ O	c.s.p. 1l

A partir de esta disolución se elaboró otra solución de lavado llamada TBST, la cual contenía un tensioactivo (Tween 20) al 0.1%.

Solución de leche al 5%

Esta solución se empleó para el bloqueo de la membrana. Se preparó disolviendo 5 g de leche en polvo semidesnatada en 100 ml de TBST.

Marcadores de peso molecular

El marcador de peso molecular que se utilizó en todos nuestros experimentos fue suministrado por Sigma® (*Chemichrome Western Control*). Se compone de un grupo de ocho proteínas de diferentes pesos moleculares que oscilan entre 8 y 220 KDa, fácilmente identificables en el gel de electroforesis y en la membrana de transferencia por su diferente color (Figura 3.2). El marcador de peso molecular también contiene un patrón de transferencia de aproximadamente 50 KDa que permite visualizar mediante quimioluminiscencia si la transferencia de proteínas del gel a la membrana se realiza correctamente. Se sembraron 2 µl del citado marcador en el primer pocillo de cada gel de electroforesis.

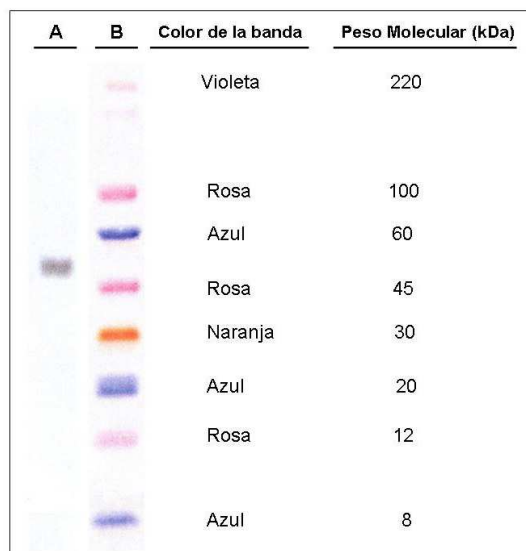


Figura 3.2.: Visualización del marcador en la membrana de transferencia donde aparecen coloreados los distintos patrones en función de su Peso Molecular **(B)** así como el patrón de transferencia **(A)**.

Anticuerpos

El anticuerpo primario utilizado en el presente trabajo fue un anticuerpo monoclonal anti-CYP2E1, suministrado por Oxford Biochemical Research (Barcelona, Spain). El anticuerpo secundario fue un anti IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con HRP (peroxidasa obtenida en rábano), el cual fue suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Madrid, Spain).

Para su mantenimiento y posterior utilización, se reconstituyeron con agua destilada, según el protocolo recomendado por el laboratorio suministrador, y se les añadió la misma cantidad de glicerol, con el fin de asegurar su conservación en congelación durante más tiempo. Para la incubación de las membranas los anticuerpos primario y secundario se diluyeron convenientemente (1:4000 y 1:10000 respectivamente) en una solución que contenía un 1% de leche en polvo en TBST.

Procedimiento

Lisado y determinación de la cantidad de proteína

Se colocó cada una de las muestras de tejido en un tubo de ensayo al que se añadieron diferentes cantidades de tampón de lisis con inhibidores de proteasas, en función del tipo de muestra (1 ml para hígado, 250 μ l para PFC, 200 μ l para NAc y 100 μ l para VTA). Se homogeneizó cada muestra durante 2 ó 3 segundos con la ayuda de un homogeneizador (UltraTurrax T-25 Basic). Seguidamente, se dejó reposar la muestra durante aproximadamente 1 hora en un baño de hielo para facilitar la eliminación del aire incorporado durante la homogeneización. Una vez transcurrido el tiempo, se introdujo el homogeneizado en tubos eppendorf que se centrifugaron durante 10 minutos a 13200 rpm a una temperatura de 4°C. Tras ello, los sobrenadantes se congelaron a -20°C.

Para la cuantificación de la proteína total presente en los sobrenadantes, se preparó una recta patrón a partir de una disolución de BSA (suero de albúmina bovina) de concentración de 1 mg/ml según el siguiente esquema de dilución:

Volumen BSA (1mg/ ml)	Volumen H ₂ O (μ l)	Concentración BSA (mg/ ml)
0 μ l	50	0
2.5 μ l	47.5	0.5
5 μ l	45	0.10
10 μ l	40	0.20

En el experimento 1 los sobrenadantes de los diferentes animales se combinaron para obtener un único sobrenadante por cada zona cerebral estudiada. Alícuotas de los diferentes sobrenadantes, por su parte, fueron diluidas adecuadamente con agua destilada (factor de dilución = 0.8) y preparadas por cuádruple. A todos los tubos (muestras y patrones) se les añadió 1ml de reactivo BIORAD® comercial diluido previamente (1:4).

Seguidamente se leyó la absorbancia de la recta patrón y de las muestras problema a una longitud de onda de 595 nm.

Mediante la interpolación de los valores de absorbancia de los sobrenadantes diluidos en la recta patrón se obtuvo, a través de los cálculos oportunos, la concentración de proteína total en las alícuotas originales.

Preparación de geles y siembra

Para la separación de proteínas se utilizó la técnica SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamida Gel electroforesis). Para ello, se prepararon geles de acrilamida sobre un soporte comercial de BIORAD® que contenía 2 cristales entre los cuales había un espacio de 1 mm. La composición de los geles fue la siguiente:

Gel de separación o resolución (Resolving gel, acrilamida al 12%)	
H ₂ O	2.19 ml
Acrilamida	3.96 ml
Tris HCl 1M pH 8.8	3.75 ml
SDS 10%	100 µl
PSA (Persulfato amónico)	100 µl
Temed (Tetramethylethylenediamine-Sigma®)	20 µl

El porcentaje de acrilamida del gel de separación fue seleccionado en función del tamaño molecular de la proteína analizada (58.6 KDa).

Gel de concentración de la muestra (Stacking gel, acrilamida al 4.5%)	
H ₂ O	3.52 ml
Acrilamida	0.75 ml
Tris HCl 1M pH 6.8	0.625 ml
SDS 10%	50 µl
PSA (Persulfato amónico)	45 µl
Temed (Tetramethylethylenediamine-Sigma®)	7 µl

Con el fin de iniciar el proceso de siembra de los sobrenadantes, éstos se descongelaron y mantuvieron en baño de hielo. A continuación, se pipeteó el volumen adecuado de cada sobrenadante para sembrar la cantidad de proteína deseada. En el experimento 1 se sembró 10, 20, 40 y 80 μg de proteína para PFC; 20, 40, 80 y 100 μg de proteína para NAc y 10, 20 y 30 μg de proteína para VTA. Como se mostrará en el siguiente capítulo, los resultados obtenidos en este primer experimento presentaron una excelente linealidad entre la cantidad de proteína sembrada y la señal cuantificada, y además permitieron elegir la cantidad de proteína adecuada de cada zona cerebral para la siembra de los sobrenadantes en el experimento 2, siendo ésta de 20, 40 y 30 μg de proteína para PFC, NAc y VTA respectivamente. En cuanto a las muestras de hígado, la cantidad de proteína seleccionada para la siembra de los sobrenadantes fue de 1 μg , seleccionada de acuerdo a estudios previos (datos no mostrados).

En el experimento 2, se sembraron en cada uno de los geles, además del marcador de peso molecular, muestras procedentes tanto de ratas control como de ratas tratadas con etanol. La secuencia de siembra se realizó de acuerdo con el siguiente esquema:

Nº pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Muestra	MPM	C	T	C	T	C	T	C	T

MPM: Marcador de Peso Molecular; **C:** muestras de ratas control; **T:** muestras de ratas tratadas con etanol.

Electroforesis, transferencia, revelado y cuantificación

Tras calentar las muestras a 100° C durante 2 minutos, éstas fueron cargadas en el gel y sometidas a una corriente eléctrica de 120 V durante 40 minutos en un equipo de ELECTROFORESIS vertical modelo Mini-Protean 3 de BIORAD®.

Al finalizar la electroforesis, los geles se extrajeron de los cristales. Las proteínas, separadas por su peso molecular, se electrotransfirieron a membranas de PVDF (polyvinylidene fluoride- 0.45µm) en un equipo de TRANSFERENCIA modelo Mini Trans-Blot de BIORAD® a 100 V durante 1 hora en agitación y a 4° C. Previamente, las membranas de transferencia fueron activadas sumergiéndolas durante 10 minutos en metanol.

A continuación, el gel se sometió a una tinción en azul de coomasie al 1%, en una solución que contenía un 30% de metanol y un 10% de ácido acético durante 20 minutos, con la finalidad de comprobar la homogeneidad en la cantidad de proteína sembrada mediante observación de las bandas.

Posteriormente, se procedió al bloqueo de la membrana con el fin de prevenir la unión no específica del anticuerpo a la misma. Para ello, la membrana se mantuvo durante 1 hora a 37° C con leche descremada en polvo al 5% en TBST.

Una vez bloqueada la membrana, se lavó con TBST y se procedió a la incubación con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en agitación.

A continuación, se lavó de nuevo la membrana con TBST y se procedió a la incubación de ésta con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. El método de revelado empleado fue la QUIMIOLUMINISCENCIA. Se utilizó el reactivo *ECL Plus Western-Blotting Detection System* (GE Healthcare®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la oxidación del luminol por acción de la peroxidasa en presencia de un potenciador (Fenol) capaz de aumentar hasta 1000 veces la luz emitida por el luminol oxidado. Las proteínas son detectadas por su unión a anticuerpos conjugados directa o indirectamente a peroxidasa de rábano.

Los líquidos de revelado se mezclaron e incubaron durante 10 minutos sobre la membrana según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se eliminó el exceso de líquido de la membrana y se expuso un tiempo variable en un sistema de detección de quimioluminiscencia (Biorad®) que muestra las bandas del antígeno reconocido por el anticuerpo, y a su vez, permite obtener

imágenes digitales. Dichas imágenes digitales se cuantificaron con ayuda del programa Quantity One versión 4.6.2. (Biorad®).

3.2.3. Expresión de los resultados y análisis estadístico

El parámetro utilizado para cuantificar el CYP2E1 en las bandas presentes en la membrana fue el volumen de la imagen de la banda que proporcionó el programa informático, expresado en unidades arbitrarias (media \pm EE).

Experimento 1

El volumen de la imagen de la banda se empleó para expresar los valores basales de CYP2E1 obtenidos en el experimento 1 (media \pm EE). Estos datos basales se trataron mediante una regresión lineal por mínimos cuadrados obteniéndose así las rectas de calibración para cada zona cerebral.

Los resultados referidos a los niveles de expresión de CYP2E1 en 20 μ g de proteína total obtenidos en las diferentes áreas cerebrales (media \pm EE), se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Scheffé.

Experimento 2

Los niveles de expresión de CYP2E1 en hígado y en las diferentes zonas tras el tratamiento de inducción farmacológica, se expresaron como porcentaje respecto al grupo control (media \pm EE), considerando los niveles de expresión del grupo control como 100%. En todos los casos se compararon los niveles de

expresión entre las ratas control y las ratas tratadas con el inductor, mediante una prueba de t de Student para datos no apareados.

El nivel de significación se fijó para todas las pruebas en 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el SPSS 12.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

3.3. ACETALDEHÍDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL. PAPEL DEL VTA Y DE LOS RECEPTORES OPIOIDES.

Tras el estudio de la presencia de uno de los componentes fundamentales de la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar el etanol en las distintas áreas del sistema MCLD y, en especial, el VTAp, decidimos comenzar con el estudio de los efectos que el acetaldehído ejerce sobre este sistema.

El estudio de los efectos de una sustancia sobre la actividad de un determinado sistema cerebral puede abordarse desde múltiples perspectivas y empleando metodologías muy diversas. En nuestros experimentos hemos optado por una aproximación comportamental. En concreto, hemos analizado las consecuencias que el etanol y el acetaldehído, directamente administrados en el VTAp, ejercen sobre un comportamiento claramente dependiente de la actividad de las neuronas DA presentes en esta región: la actividad motora exploratoria (Pankseep. 1998). El objetivo ha sido determinar si los efectos que el etanol es capaz de ejercer sobre la actividad de estas neuronas es dependiente, al menos en parte, del acetaldehído localmente generado al metabolizarse la droga.

El estudio de los efectos del etanol y acetaldehído sobre la actividad locomotora exploratoria se ha realizado mediante la evaluación de las distancias recorridas por los animales tras la microinyección a nivel cerebral de estos compuestos. Concretamente, se diseñaron los siguientes experimentos:

- Experimento 3: Efectos de la administración **aguda** intra-VTAp de etanol o acetaldehído sobre la actividad locomotora de la rata.
- Experimentos 4 y 5: Estudio del papel de los **receptores opioides** en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.
- Experimentos 6 y 7: Efectos del **secuestro del acetaldehído** sobre la activación comportamental derivada de la administración intra-VTAp de etanol.
- Experimento 8: Estudio de los fenómenos de sensibilización y/o tolerancia comportamental tras la administración **repetida** intra-VTAp de etanol.

3.3.1. Soluciones de trabajo y sustancias químicas empleadas

Solución de fluido cerebrospinal (aCSF)

Todos los experimentos que usaron microinyecciones *in vivo* en VTAp se realizaron empleando una solución aCSF a un pH de 6.5. La composición de la misma fue:

Compuesto	Concentración	
	g/l	mM
NaCl	7.02	120
KCl	0.36	4.8
KH ₂ PO ₄	0.16	1.2
MgCl ₂	0.24	1.2
NaHCO ₃	2.1	25
CaCl ₂	0.37	2.5
D-glucosa	3.42	10
Ascorbato	0.0352	0.2

Sustancias químicas

Tanto el etanol (100% v/v sin indicador, suministrado por Scharlau, Madrid, Spain), como el acetaldehído (suministrado por Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) se diluyeron convenientemente en aCSF en el momento de su utilización, con el fin de obtener las dosis a ensayar.

El DAMGO, un agonista selectivo de los receptores opioides de tipo μ , fue suministrado por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Su estructura química se muestra en la Figura 3.3. Dicho agonista se disolvió en agua destilada a la concentración deseada y se congeló a -20°C . En el momento de su uso, se descongeló y se diluyó convenientemente en aCSF.

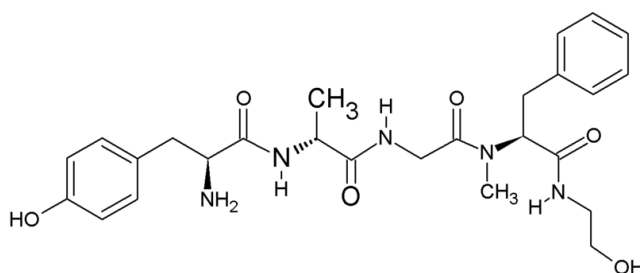


Figura 3.3.: Estructura química del DAMGO.

El clorhidrato de naltrexona (NTX), un antagonista de amplio espectro de los receptores opioides, así como, el clorhidrato de β -Funaltrexamina (β -FNA), un antagonista irreversible específico de los receptores opioides de tipo μ , fueron suministrados por Tocris (Bristol, UK). Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 3.4. Ambos antagonistas se disolvieron en agua destilada a la concentración deseada y se congelaron a -20°C . En el momento de su uso, se descongelaron y diluyeron convenientemente con aCSF (naltrexona) o con agua (β -Funaltrexamina).

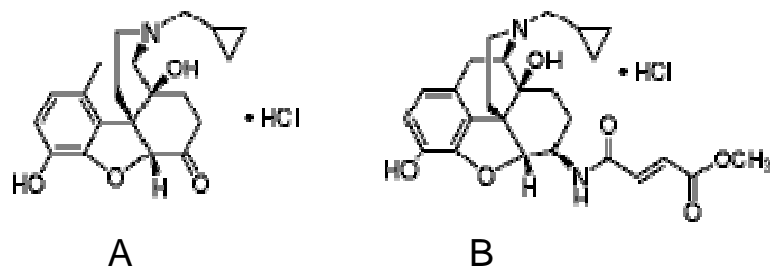


Figura 3.4.: Estructuras químicas de los clorhidratos de naltrexona (A) y β -Funaltrexamina (B)

La D-penicilamina, un agente secuestrante del acetaldehído, fue suministrado por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Su estructura química se muestra en la Figura 3.5. En el momento de su uso, se disolvió convenientemente en salino fisiológico en función de la dosis deseada.

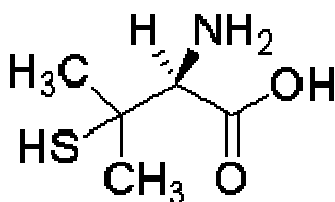


Figura 3.5: Estructura química de la D-penicilamina.

3.3.2. Método quirúrgico

A todos los animales empleados en estos experimentos se les implantó unilateralmente una cánula guía en el VTAp para la realización de la/s microinyección/es de la/s sustancia/s. El proceso comenzó con la anestesia del animal mediante inyección i.p. de una solución de Hidrato de Cloral (400 mg/kg) (Experimentos 3 a 5 y 8A-B), o bien de una solución que contenía una mezcla de ketamina/xilacina (95 mg/ kg de ketamina y 10 mg/ kg de xilacina) (Experimentos 6, 7 y 8C). Una vez anestesiados, los animales se colocaron en

un equipo estereotáxico (Stoelting®). Tras ello, se practicó una incisión longitudinal (1-2 cm) en la piel de la parte superior de la cabeza y en los bordes de la incisión se administró un gel de lidocaína al 10%. De este modo quedó a la vista el cráneo del animal, permitiendo la visualización de los puntos bregma y lambda que sirvieron de referencia para posicionar la cánula correctamente y determinar las coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson. 2007). Se practicaron 3 orificios en el cráneo, dos para los tornillos de anclaje y el otro para la implantación de una cánula guía de 28G (Plastics One, USA) (Figura 3.6.a).

Las coordenadas fueron seleccionadas para que la cánula guía quedara posicionada 1 mm por encima del VTAp. Las coordenadas relativas a bregma y a la superficie del cráneo fueron las siguientes:

- A/P -5.8 mm; L \pm 2.1 mm; D/V -8.1 mm. La cánula fue introducida con un ángulo de $\pm 10^\circ$ respecto a la vertical (Paxinos y Watson. 2007).

Dicha cánula se fijó con cemento dental Rapid Repair (Dentsplay®). Cuando endureció el cemento dental, se procedió a desinfectar la herida con povidona yodada al 10% y se suturó con hilo de seda. La cánula fue obturada con un tapón especial de 33G (Plastics One, USA) (Figura 3.6.b) en el que el vástago sobresalía 1 mm distalmente al extremo de la cánula.

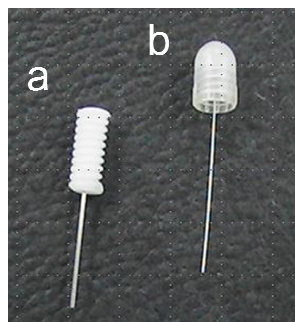


Figura 3.6: Cánula de microinyección (a) y tapón para dicha cánula (b).

Tras la cirugía, los animales se estabularon individualmente en cajas plásticas rectangulares con libre acceso a comida y agua, al menos durante 7 días. Las cajas fueron colocadas una al lado de la otra para prevenir la aparición de estrés crónico debido al aislamiento.

3.3.3. Diseño experimental

Experimento 3. Efectos de la administración intra-VTAp aguda de etanol o acetaldehído sobre la actividad locomotora de la rata

En este experimento se emplearon un total de 30 animales que se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos con el fin de evaluar: (i) si el etanol y el acetaldehído son capaces de provocar activación locomotora tras su administración aguda intra-VTAp y (ii) seleccionar la dosis más adecuada para realizar los experimentos adicionales.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (n= 6/ grupo) para evaluar los efectos de la administración intra-VTAp aguda de dos dosis diferentes de etanol (ETOH) o acetaldehído (ACD). Las dosis fueron seleccionadas en base a estudios previos que analizaron los efectos de ambas sustancias sobre la actividad locomotora de la rata tras la administración intranigral (Arizzi-LaFrance y col. 2006). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Grupo aCSF (control)
- Grupo ETOH 75 nmoles
- Grupo ETOH 150 nmoles
- Grupo ACD 25 nmoles
- Grupo ACD 250 nmoles

Los resultados de este primer experimento, además de informar sobre los efectos de estas sustancias sobre la actividad motora de los animales permitieron seleccionar las dosis de etanol (150 nmoles) y acetaldehído (250 nmoles) más adecuadas para la realización del resto de experimentos.

Experimento 4. Estudio de la participación de los receptores opioides en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.

En este experimento se utilizaron 20 animales repartidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales (n= 5/grupo) para determinar si el bloqueo inespecífico de los receptores opioides en el VTAp permitiría atenuar o suprimir los efectos activantes de las inyecciones intra-VTAp de etanol (150 nmoles) y acetaldehído (250 nmoles). Para ello, seleccionamos el antagonista de los receptores opioides de amplio espectro, naltrexona (NTX), que se administró a la dosis de 13.2 nmoles (McDonald y Siegel. 2004). Para evitar la posibilidad de una interacción físico-química entre la naltrexona y el acetaldehído en la solución de administración, se llevaron a cabo infusiones de los compuestos por separado. De este modo, las inyecciones de naltrexona se realizaron con una antelación de 5 minutos con respecto a la administración del vehículo, etanol o acetaldehído. Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos en los animales que recibieron dos administraciones de vehículo (aCSF). Así pues, los grupos experimentales diseñados fueron los siguientes:

- Grupo aCSF/ aCSF (control)
- Grupo NTX/ aCSF
- Grupo NTX/ ETOH
- Grupo NTX/ ACD

Experimento 5. Estudio de la participación de los receptores opioides de tipo μ en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.

En estos experimentos se emplearon 38 animales ($n=6/$ grupo), 20 en el experimento 5A y 18 en el experimento 5B, con el fin de determinar si el bloqueo de los receptores opioides de tipo μ con el antagonista selectivo β -Funaltrexamina (β -FNA) permitiría atenuar o suprimir los efectos activadores de las inyecciones intra-VTAp de etanol (150 nmoles) o acetaldehído (250 nmoles).

Experimento 5A: Capacidad de la β -Funaltrexamina para suprimir los efectos activadores producidos por el etanol y el acetaldehído

En este experimento se procedió a evaluar la capacidad de la β -FNA para suprimir los efectos activadores producidos por el etanol y el acetaldehído, a la dosis inicialmente seleccionada (2.5 nmoles, Ward y col. 2003). En el presente trabajo la β -FNA fue administrada 24 h antes del tratamiento con vehículo, etanol (150 nmoles) o acetaldehído (250 nmoles) (Latimer y col. 1987). Los resultados se compararon con un grupo control que recibió dos microinyecciones de vehículo siguiendo el mismo protocolo. Se empleó para ello, como ya se indicó más arriba, un total de 20 animales repartidos en los siguientes 4 grupos experimentales ($n=5$ /grupo):

- Grupo aCSF/ aCSF
- Grupo β -FNA/ aCSF
- Grupo β -FNA/ ETOH
- Grupo β -FNA/ ACD

Experimento 5B: Eficacia del bloqueo de los receptores opioides μ por la β -Funaltrexamina

Con el fin de evaluar la eficacia bloqueante de la β -FNA sobre los receptores opioides de tipo μ a la dosis seleccionada (2.5 nmoles, (Ward y col. 2003), se determinó la capacidad bloqueante de este antagonista sobre los efectos activadores del agonista de los receptores opioides DAMGO. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que el DAMGO administrado directamente en VTA induce una conspicua activación motora en las ratas (Latimer y col. 1987; Vezina y col. 1987; Calenco-Choukroun y col. 1991), además de una elevación notable de los niveles de dopamina en NAc (Latimer y col. 1987; Devine y col. 1993) siendo pues, este agonista el compuesto ideal para demostrar la eficacia bloqueante de la dosis de β -FNA seleccionada para nuestros experimentos. Así pues los grupos en este experimento, estuvieron constituidos por 6 animales/grupo y fueron los siguientes:

- Grupo aCSF/ aCSF
- Grupo aCSF/ DAMGO
- Grupo β -FNA/ DAMGO

Experimento 6. Efectos del secuestro del acetaldehído sobre la activación comportamental derivada de la administración intra-VTAp de etanol.

Si los efectos del etanol sobre la actividad motora de los animales dependen del acetaldehído generado tras metabolizarse localmente la droga en el VTAp, el secuestro del acetaldehído formado debería suprimir la activación motora consecutiva a la administración del etanol.

Para comprobar esta hipótesis se emplearon 96 animales (n= 8/ grupo), repartidos en dos experimentos: 6A (64 animales) y 6B (32 animales).

Experimento 6A: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol

En primer lugar, con el objetivo de evaluar si la administración sistémica (i.p.) de D-Penicilamina (DP) permite prevenir la activación locomotora producida por la administración intra-VTAp de etanol, se ensayaron tres dosis de DP: 12.5, 25 y 50 mg/ kg. Estas dosis se seleccionaron de acuerdo con estudios publicados previamente (Font y col. 2005). Para ello, la DP se disolvió en suero salino fisiológico a distintas concentraciones según la dosis a administrar (0.013 M, 0.025 M, 0.05 M), para su inyección i.p. 30 minutos antes de la microinyección de aCSF o etanol (150 nmoles) intra-VTAp. Así pues, los grupos en este experimento fueron los siguientes:

- Grupo DP 0/ aCSF
- Grupo DP 0/ ETOH
- Grupo DP 12.5/ aCSF
- Grupo DP 12.5/ ETOH
- Grupo DP 25/ aCSF
- Grupo DP 25/ ETOH
- Grupo DP 50/ aCSF
- Grupo DP 50/ ETOH

Experimento 6B: Efecto de la administración sistémica de la D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de DAMGO

El objetivo de este experimento fue evaluar la especificidad de acción de la DP. Para ello se analizaron los efectos de la administración i.p. previa de DP (50 mg/ kg) sobre los efectos estimulantes locomotores producidos por la microinyección de DAMGO (0.13 nmoles) enVTAp. Así pues los grupos en este experimento fueron los siguientes:

- Grupo DP0/ aCSF
- Grupo DP0/ DAMGO
- Grupo DP 50/ aCSF
- Grupo DP 50/ DAMGO

Experimento 7. Efectos del etanol a bajas dosis sobre la actividad locomotora de las ratas en presencia de D-Penicilamina

Este experimento se diseñó tras comprobar en el experimento 6A que la administración de dosis elevadas de DP en conjunción con etanol conducía a una actividad motora ligeramente inferior a la observada en los animales control, lo que sugería un efecto depresor para el etanol en presencia de elevados niveles del agente secuestrante. Aunque, como se detallará en el capítulo de resultados, esta tendencia no fue estadísticamente significativa, decidimos explorar en el presente experimento la posibilidad de que el etanol pudiera ejercer efectos depresores sobre la actividad motora cuando se maximiza el secuestro del acetaldehído derivado de su metabolismo.

Se diseñaron así dos subexperimentos:

Experimento 7A: Efecto de la administración intra-VTAp aguda de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora

En primer lugar, se ensayaron los efectos de la administración intra-VTAp de una dosis de etanol de 35 nmoles sobre la actividad locomotora de los animales. Para ello, se emplearon 10 animales repartidos en dos grupos:

- Grupo aCSF (n=4)
- Grupo ETOH 35 (n=6)

Experimento 7B: Efecto de la administración intra-VTAp aguda de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora en presencia de D-Penicilamina

En segundo lugar, se analizó la actividad motora de los animales tras la administración de DP (50 mg/ kg) 30 minutos antes de la microinyección de etanol (35 nmoles) intra-VTAp. Para ello, se emplearon 14 animales (n= 7/ grupo) repartidos en dos grupos:

- Grupo DP 0
- Grupo DP 50

Experimento 8. Estudio de los fenómenos de sensibilización y/o tolerancia comportamental tras la administración repetida intra-VTAp de etanol

La administración repetida en ratas, según diferentes protocolos, de algunas drogas de abuso, y en concreto, de diversos opioides, conduce a un fenómeno de sensibilización de las respuestas activadoras motoras (Bartoletti y col. 1987; Vezina y col. 1987; Chefer y Shippenberg. 2009). En el caso del etanol, este fenómeno de sensibilización no ha sido descrito con total certidumbre. Los siguientes experimentos se plantearon con la intención de profundizar en este aspecto poco estudiado de la farmacología del etanol. En concreto, se realizaron dos protocolos y tres subexperimentos:

Experimento 8A: Protocolo de administración 1. Estudios con etanol.

El protocolo de administración 1 para la administración de los agentes farmacológicos estudiados aparece esquematizado en la figura 3.8:

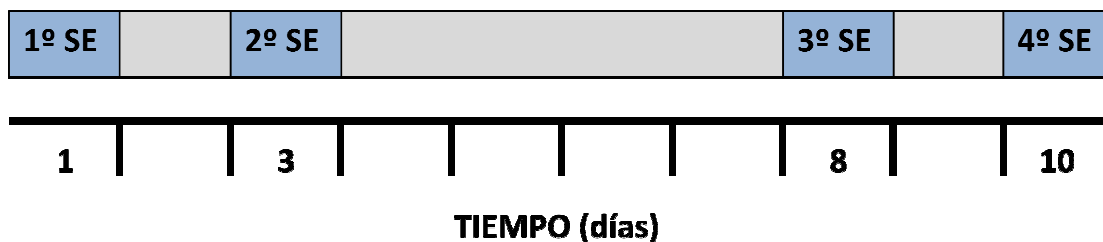


Figura 3.8.: Protocolo de administración utilizado en el Experimento 8A y 8B. Los cuadros en color azul indican las sesiones experimentales (SE).

En este subexperimento, los animales recibieron en total 4 administraciones de etanol (150 nmoles) o aCSF (1 por sesión experimental) espaciadas irregularmente a lo largo de 10 días. En cada sesión experimental se evaluó la actividad motora tras la administración del etanol (o del vehículo). Se emplearon en este experimento un total de 20 animales repartidos en dos grupos experimentales (n=10/ grupo). Así pues los grupos fueron los siguientes:

- Grupo aCSF
- Grupo ETOH

Experimento 8B: Protocolo de administración 1. Estudios con DAMGO.

Con el fin de confirmar la validez del protocolo experimental utilizado para la génesis de un fenómeno de sensibilización motora, se procedió en este experimento a evaluar los efectos sensibilizantes producidos por la administración repetida del agonista de los receptores opioides de tipo μ , DAMGO, directamente intra-VTAp a la dosis de 0.13 nmoles. Para la realización de este subexperimento se emplearon 16 animales (n= 8/ grupo repartidos en los siguientes grupos:

- Grupo aCSF
- Grupo DAMGO

Experimento 8C. Protocolo de administración 2. Estudios con etanol.

En este experimento se decidió utilizar un protocolo de administración del etanol, diferente al empleado en los experimentos 8A y 8B. Dos razones motivaron este cambio. La primera estuvo relacionada con la reciente publicación de un estudio (Ding y col. 2009) en el que se demostraba que la administración de 7 dosis de etanol en días consecutivos (cada 24 horas) conducía a una sensibilización en las respuestas neuroquímicas de las neuronas DA del VTA al etanol, lo que inicialmente podría traducirse en una sensibilización motora. El segundo motivo fue intentar confirmar las conclusiones derivadas de los resultados de nuestro experimento 8A, empleando un protocolo de administración del etanol diferente.

El protocolo utilizado para la administración repetida en este experimento aparece esquematizado en la Figura 3.9.

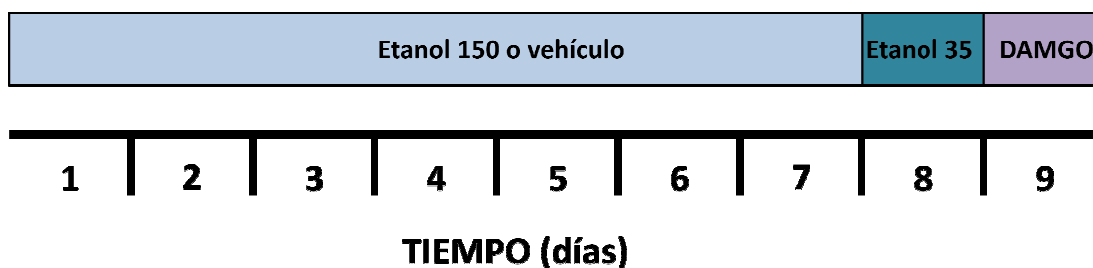


Figura 3.9.: Protocolo de administración utilizado en el Experimento 8C. El cuadro en color azul indica la administración repetida de etanol (150 nmoles) o vehículo, el cuadro de color verde la administración de 35 nmoles de etanol y el cuadro morado la administración de 0.0013 nmoles de DAMGO.

Como se aprecia los animales recibieron en total 9 administraciones (1 por sesión experimental) espaciadas 24 horas. En cada sesión experimental se evaluó la actividad motora tras la microinyección de las diferentes sustancias. Se emplearon en este experimento 30 animales repartidos en 2 grupos (n=15/

grupo) que recibieron 150 nmoles de etanol o vehículo durante 7 días consecutivos, según el grupo experimental. Por tanto, los grupos fueron:

- Grupo aCSF
- Grupo ETOH

En el 8º día todos los animales recibieron una única dosis de 35 nmoles de etanol (administración que denominamos “challenge test 1”) con objeto de determinar si hubo sensibilización a las respuestas motoras generadas por el etanol, sólo que en este challenge test 1 se ensayó una dosis de etanol baja, que en experimentos de administración aguda no es capaz de producir activación locomotora.

En el 9º día todos los animales recibieron, además, una única dosis de 0.0013 nmoles de DAMGO (administración que denominamos “challenge test 2”) con objeto de determinar si hubo sensibilización a las respuestas motoras mediadas por los receptores opioides de tipo μ .

3.3.4. Procedimiento experimental

Los procedimientos empleados en este bloque de experiencias (experimentos 3-8) para la manipulación, administración de los compuestos y evaluación de la actividad motora fueron comunes y se describen conjuntamente a continuación.

Manipulación de los animales: procedimiento de habituación

Transcurridos tres días tras la cirugía, los animales se sometieron a un proceso de manipulación (*handling*) en la habitación de experimentación durante 5 minutos diarios hasta el día del experimento. Durante esta fase, los animales se habituaron al experimentador, a la habitación donde se realizaron los

experimentos, y al procedimiento de administración intra-VTA_p (el procedimiento de microinyección se simuló retirando e insertando el tapón en la cánula guía), realizándose un total de entre 4 y 7 sesiones de manipulación antes del inicio del experimento, con objeto de disminuir los inevitables efectos activantes debidos a la novedad y al propio proceso de administración.

Procedimiento de microinyección intra-VTA_p

Las microinyecciones de las diferentes soluciones se realizaron en la habitación experimental con ayuda de un inyector metálico de 33 G (Plastics One, USA) (Figura 3.10), cuyo extremo distal sobresalía 1 mm del final de la cánula guía. Los inyectores se conectaron mediante un tubo de polietileno PE-10, a una jeringa Hamilton de 25 μ l, y las microinyecciones de las distintas soluciones se realizaron mediante una bomba de infusión (Kd Scientific), que se programó para inyectar un volumen de 200 nl en 20 segundos (0.6 μ l/ min), con la excepción de las microinyecciones de β -FNA, durante las cuales la bomba se programó para la inyección de un volumen de 300 nl con una velocidad de infusión de 0.15 μ l/ min. Tras la infusión, el inyector se mantuvo en el interior de la cánula durante un minuto, para permitir la correcta difusión del compuesto administrado. Finalizado este tiempo, el inyector se retiró y sustituyó por el tapón.



Figura 3.10: Inyector para microinyección.

Procedimiento de evaluación de la actividad locomotora

Para la realización del ensayo, los animales se trasladaron de la colonia a la habitación experimental, iluminada con una luz blanca tenue. Los animales se mantuvieron en la habitación experimental entre 20-30 minutos antes de realizar la microinyección. La inyección en VTAp se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el epígrafe anterior. En el caso del experimento 8, este procedimiento se repitió en cada sesión experimental.

Las cajas empleadas para el ensayo de actividad locomotora fueron las propias cajas de estabulación para los experimentos 3 - 8 (30 x 15 x 14 cm³). Para los experimentos 8A y 8B, sin embargo, se emplearon cajas negras de metacrilato de campo abierto (60 x 30 x 30 cm³), a las cuales los animales fueron habituados el día previo a la 1^a sesión experimental, con objeto de disminuir los efectos activantes producidos por la novedad del entorno.

Tras la microinyección se grabó el comportamiento del animal mediante una cámara de vídeo digital durante un periodo de 60 minutos, para los experimentos 3-5, o 20 minutos, para los experimentos 6-8. El parámetro evaluado en todos los experimentos fue la distancia recorrida, expresada en cm, por los animales durante el tiempo de grabación. Dicha distancia se analizó mediante el programa Raddott (Universidad de Valencia).

En la Figura 3.11 se muestra un esquema del procedimiento del ensayo para las sesiones experimentales de cada experimento.

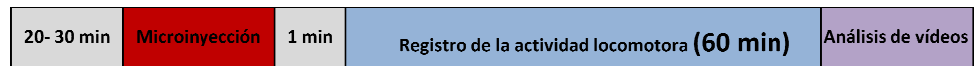
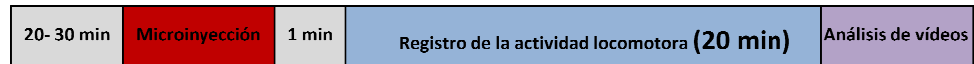
Experimentos 3, 4 y 5**Experimentos 6 y 7B****Experimentos 7A y 8**

Figura 3.11: Esquema de microinyección, registro y análisis de la actividad locomotora en las sesiones experimentales de los diferentes experimentos.

3.3.5. Validación histológica

Una vez finalizados los experimentos, se procedió a la confirmación de la posición de la cánula mediante evaluación histológica en todos y cada uno de los animales empleados en los diferentes experimentos. Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/ kg) para ser sacrificadas, aunque el procedimiento empleado fue diferente según el experimento, puesto que en algunos experimentos los cerebros se destinaron a la realización de ensayos inmunohistoquímicos no incluidos en esta Tesis.

Experimentos 3, 4 y 5

Tras la anestesia de los animales, éstos se sometieron a una perfusión por vía intracardiaca con una solución salina de fosfatos (PBS, preparada a partir de una solución más concentrada, PBS x 10). A continuación, se perfundieron 200

ml de una solución de tampón fosfato 0.1M (PB) con un 4% de formaldehído. Las composiciones de las soluciones fueron las siguientes:

PBS para perfusión		Formaldehído en PB 0.1M pH= 7.4	
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0.345 g	Na ₂ HPO ₄	10.645 g
Na ₂ HPO ₄	1.065 g	NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	3.9 g
ClNa	8.3 g	Formol comercial al 37%	100 ml
H ₂ O	c.s.p. 1 l	H ₂ O	c.s.p. 1 l

Posteriormente, los cerebros fueron post-fijados en la misma solución de formaldehído empleada para la perfusión, durante 24h. Transcurrido este tiempo, se trasladaron a una solución al 30% de sacarosa en PB 0.1 M, cuya composición fue la siguiente:

Sacarosa 30% en PB 0.1M	
Solución de PB 0.4M	7.5 ml
Sacarosa	9 g
Solución de azida sódica 4%	15 µl
H ₂ O	c.s.p. 30 ml

Los cerebros se mantuvieron sumergidos en esta solución de sacarosa hasta que se embebieron por completo de la misma. Tras ello, se congelaron a -20°C y se cortaron en secciones coronales de 40 µm de espesor mediante el uso de un microtomo de congelación. Estas secciones coronales se montaron en portaobjetos y se sometieron a una tinción de Nissl, con violeta de cresilo como colorante. Tras la tinción de los cortes histológicos, se procedió a la validación histológica de la cánula implantada a través de microscopía óptica y según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007). Los criterios de aceptación para la posición de la cánula guía fueron (Ikemoto. 2007):

- A/P: -5.28/ -6.84 mm; L: ±1.9/ ±2.3 mm; V -7.9/ -8.3 mm

En la figura 3.12 se muestra una microfotografía de un corte coronal típico con cánula en VTAp.

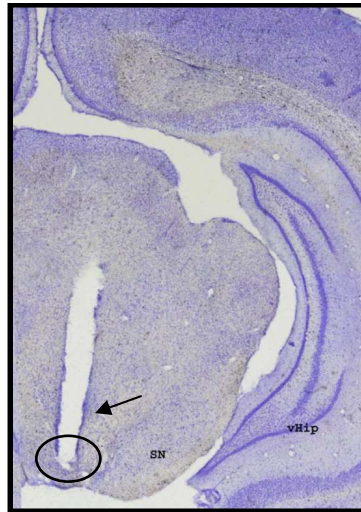


Figura 3.12: Microfotografía de una sección coronal de cerebro de rata teñida con violeta de cresilo, en la cual se aprecia el tracto correspondiente a la cánula en VTAp. La flecha indica el tracto de la cánula, así como el círculo el VTA.

Abreviaturas: **SN**, *substantia nigra*, **vHip**, hipocampo ventral.

Experimentos 6, 7, y 8

Tras el sacrificio de los animales, se procedió a la extracción y congelación de los cerebros a -20°C . A continuación, los cerebros se cortaron en secciones coronales de $40\ \mu\text{m}$ de espesor en un criostato. Estas secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados y se sometieron a una tinción con violeta de cresilo. Tras la tinción de los cortes histológicos, se procedió a la validación histológica de la cánula implantada a través de microscopía óptica y según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007). Los criterios de aceptación fueron los mismos que para los experimentos 3, 4 y 5.

3.3.6. Tratamiento de datos y análisis estadístico

En todos los experimentos, los resultados se expresan como la distancia media recorrida (en centímetros) a lo largo de la sesión experimental, junto con su error estándar de la media (EE).

Experimentos 3, 4 y 5

Con objeto de analizar los efectos de la administración intra-VTAp aguda de etanol y acetaldehído sobre la actividad locomotora de los animales, se analizó la distancia total recorrida por los animales durante la sesión experimental (60 min) mediante una ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet.

El análisis de los efectos derivados del bloqueo de los receptores opioides sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol, acetaldehído o DAMGO, se realizó mediante un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet.

Experimento 6

El análisis estadístico de los resultados se abordó en ambos subexperimentos (6A y 6B) mediante un ANOVA de dos vías considerando los factores “administración intra-VTAp” con 2 niveles y “dosis de DP” con 4 niveles para los datos procedentes del experimento 6A, y la “administración intra-VTAp” con 2 niveles y “dosis de DP” con 2 niveles para los datos procedentes del experimento 6B. Cuando se detectó una interacción significativa el análisis estadístico se continuó con un análisis de los efectos simples principales utilizando la corrección de Bonferroni en las comparaciones múltiples.

Experimento 7

El análisis de los efectos de la administración intra-VTAp de una pequeña dosis de etanol sobre la actividad locomotora, en ausencia y presencia de DP, se realizó mediante una *t* de Student para datos no apareados.

Experimento 8

El análisis de los efectos de la administración intra-VTAp repetida de aCSF, etanol, o DAMGO sobre la actividad locomotora de los animales se realizó con el estudio de la distancia total recorrida por los animales durante la sesión experimental (20 minutos). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA mixto de dos vías con medidas repetidas, considerando el factor “tiempo” como factor intra-sujeto y el factor “tratamiento” como factor entre-sujeto. Cuando en dicho análisis se detectaron diferencias significativas en alguno de los factores o en la interacción se procedió a realizar un análisis de efectos simples, usando la corrección de Bonferroni en las comparaciones múltiples.

En el experimento 8C, el análisis estadístico de los efectos de la administración intra-VTAp de etanol (35 nmoles) (challenge test 1) o DAMGO (0.013 nmoles) (challenge test 2) sobre la actividad locomotora de los animales previamente tratados de modo repetido con etanol o vehículo, se realizó mediante una *t* de Student para datos no apareados.

El nivel de significación para todas las pruebas de todos los experimentos fue de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el SPSS 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO

4.1.1. Experimento 1. Determinación de los niveles de expresión basal del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata

Nuestros resultados muestran, mediante el empleo de la técnica *Western blot*, que el CYP2E1 se expresa de modo significativo en las tres áreas del sistema MCLD (PFC, NAc y VTA) del cerebro de la rata estudiadas. Para la detección de la banda de CYP2E1 en los *immunoblots* se empleó un marcaje inmunoreactivo, que permitió observar que las bandas pertenecientes a las muestras de cerebro co-migraban con las bandas de muestras de hígado de rata, como se observa en la Figura 4.1, siendo además cercanas a la banda inmunoreactiva del marcador de peso molecular de ~ 50 KDa, como puede observarse en los *immunoblots* de las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.

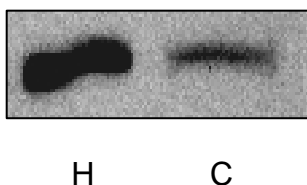


Figura 4.1: Bandas inmunoreactivas de hígado (H) y cerebro de rata (C) por *Western blot*.

Se realizaron ensayos de dilución de la proteína para cada región cerebral (rectas de calibración), con objetivo de evaluar la linealidad entre la señal y la cantidad de proteína presente en la muestra, y de determinar los niveles de expresión del CYP2E1 en cada una de las zonas cerebrales ensayadas. Además, estos ensayos nos permitieron conocer la cantidad adecuada de proteína a sembrar para el experimento 2, descrito en el siguiente apartado. En estos ensayos se observó un excelente ámbito de linealidad en la detección del CYP2E1, diferente para cada región cerebral, indicando de este modo, diferencias en los niveles de expresión.

En la Figura 4.2 se muestra la representación gráfica de la recta de calibración obtenida en el ensayo de dilución de proteína para PFC, así como la fotografía del *immunoblot* correspondiente a dicha recta. La señal reactiva para el CYP2E1 fue lineal entre 10 y 80 μg de proteína sembrada con un coeficiente de correlación de 0.998.

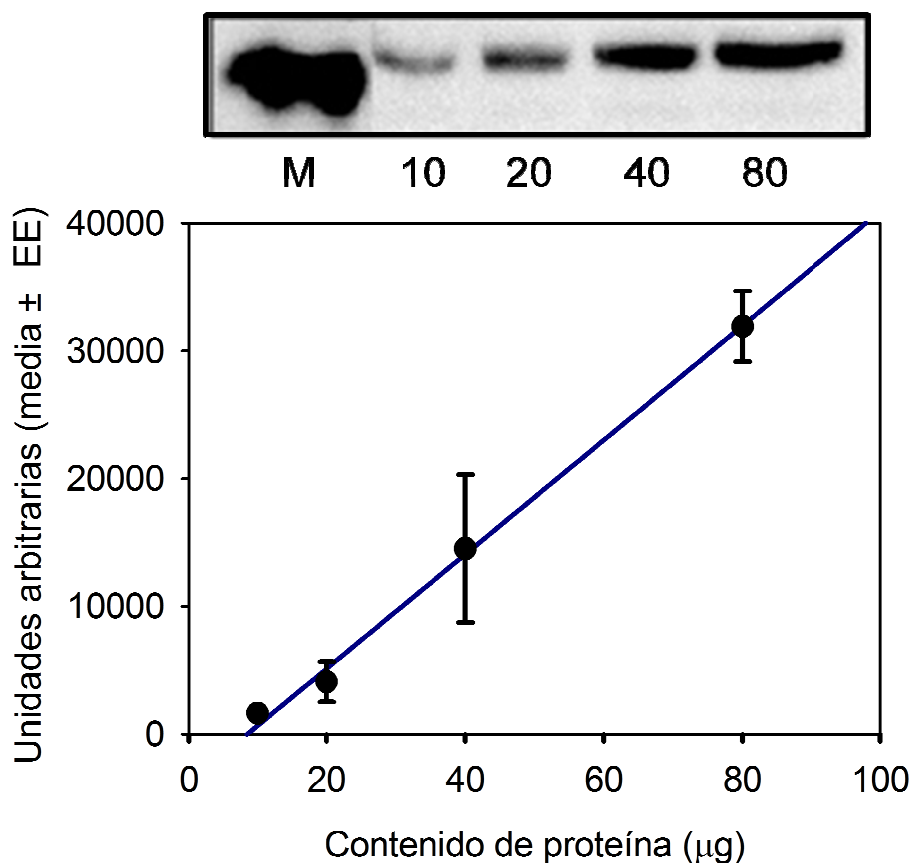


Figura 4.2.: Detección lineal de los niveles de expresión de CYP2E1 en PFC: Fotografía del *immunoblot* y representación gráfica de un ensayo de dilución de muestras (10, 20, 40, 80 μg y M (marcador de peso molecular)) (n= 3-4) (media \pm error estándar, EE).

En la Figura 4.3 se muestra la representación gráfica de la recta de calibración obtenida en el ensayo de dilución de proteína para las muestras procedentes del NAc, así como la fotografía del *immunoblot* correspondiente a dicha recta. La señal reactiva para el CYP2E1 fue lineal entre 20 y 100 μg de proteína sembrada con un coeficiente de correlación de 0.995.

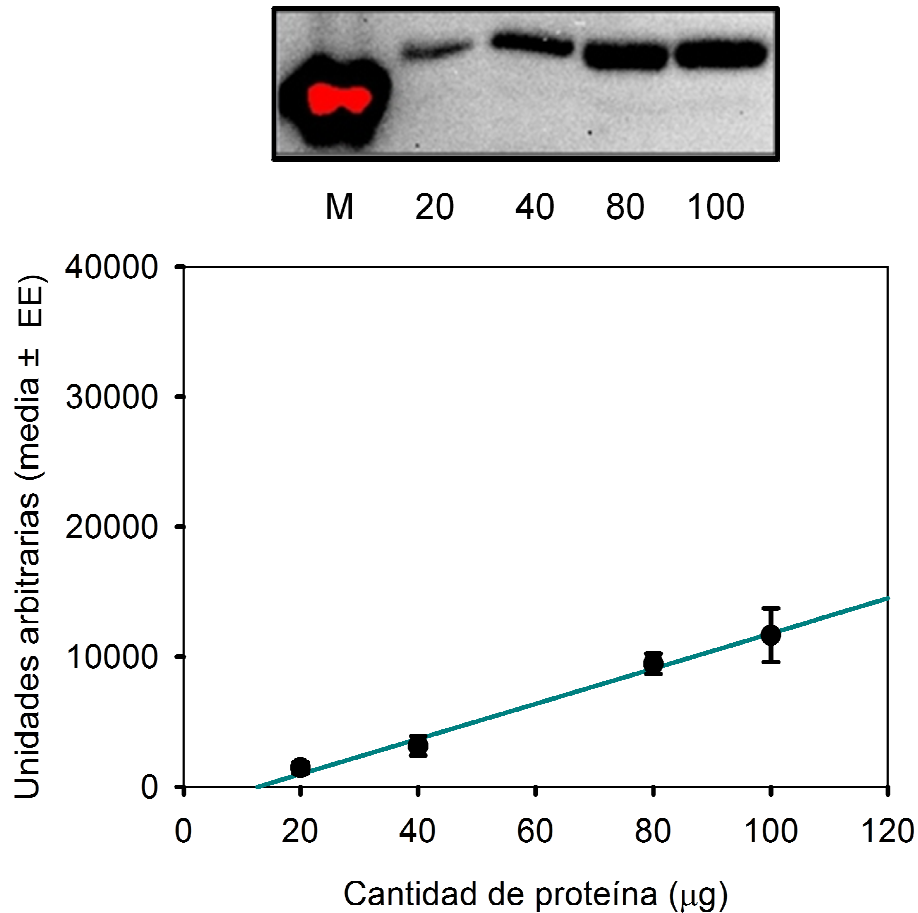


Figura 4.3: Detección lineal de los niveles de expresión de CYP2E1 en NAc: Fotografía del *immunoblot* y representación gráfica de un ensayo de dilución de muestras de NAc (20, 40, 80, 100 μg y M (marcador de peso molecular)) (n= 3-4) (media \pm error estándar, EE).

En la Figura 4.4 se muestra la representación gráfica de la recta de calibración obtenida en el ensayo de dilución de proteína para muestras procedentes del VTA, así como la fotografía del *immunoblot* correspondiente a dicha recta. La señal reactiva para el CYP2E1 fue lineal entre 10 y 30 μg de proteína sembrada con un coeficiente de correlación de 0.959.

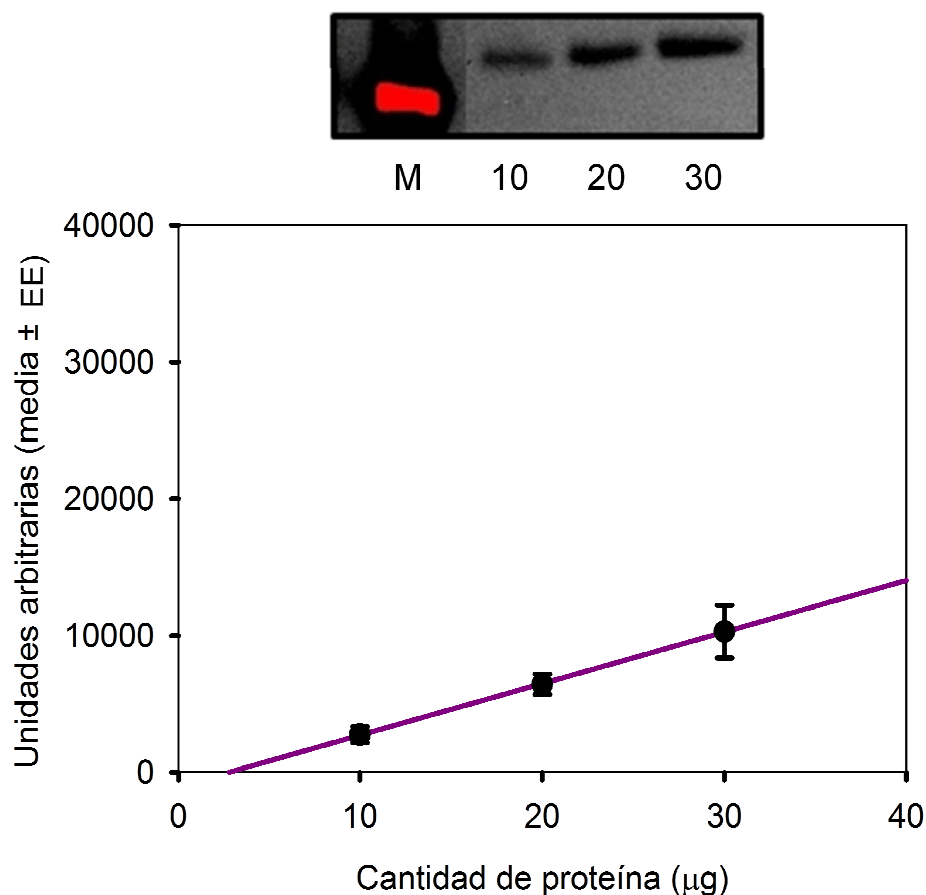


Figura 4.4: Detección lineal de los niveles de expresión de CYP2E1 en VTA: Fotografía del *immunoblot* y representación gráfica de un ensayo de dilución de muestras (10, 20, 30 μg y M (marcador de peso molecular)) (n=4) (media \pm error estándar, EE).

Estos resultados, además de poner en evidencia la validez de la técnica de cuantificación del CYP2E1, nos permitieron comparar los niveles de expresión en las tres áreas cerebrales. Para ello, se compararon los valores de expresión de CYP2E1 correspondientes a la siembra de 20 μg de proteína de cada uno de los ensayos de dilución de cada zona cerebral. Los valores se muestran gráficamente en la Figura 4.5. Para su comparación se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA de una vía que puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en estas tres regiones ($F(2,5) = 0.13$, $P = 0.013$). Además, el análisis *post hoc* (prueba de Scheffé) mostró que los niveles de expresión en NAc fueron significativamente más bajos, aproximadamente 4 veces menores, que los hallados en PFC y VTA ($p < 0.05$ para ambos casos). Entre estas dos últimas áreas, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión.

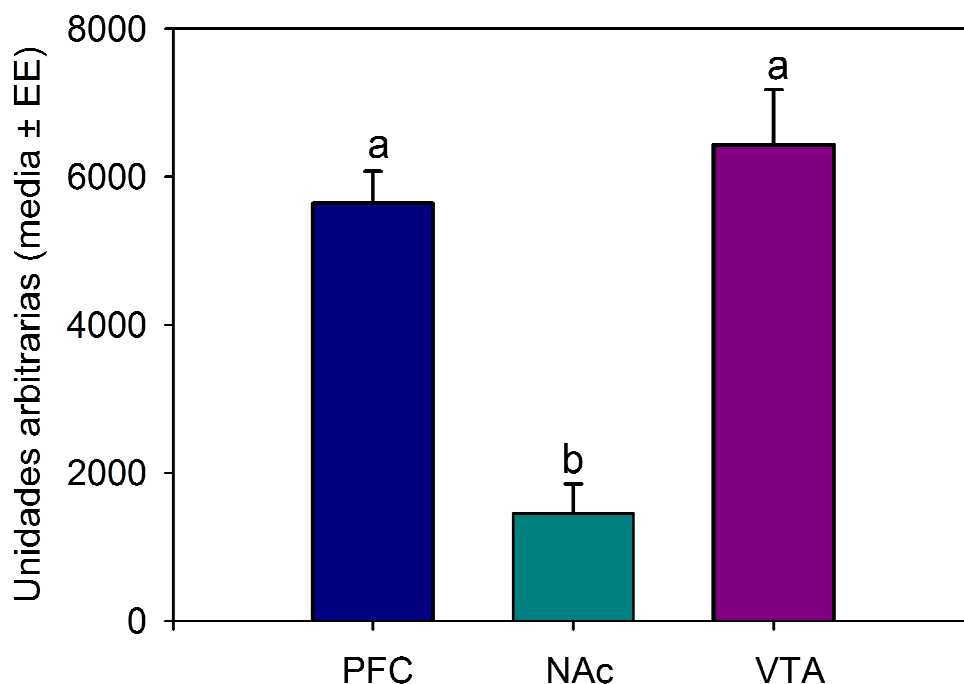


Figura 4.5: Expresión de los niveles de CYP2E1 en el sistema MCLD. Las barras representan los niveles de CYP2E1 correspondientes a 20 μg de proteína sembrada de cada una de las áreas cerebrales (media \pm EE) ($n = 3-4$). Las barras con letras distintas (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Como era de esperar, los resultados de nuestros experimentos también mostraron que la expresión de CYP2E1 en las muestras cerebrales es claramente inferior a la encontrada en las muestras hepáticas. Concretamente, los niveles enzimáticos en PFC, NAc y VTA fueron, aproximadamente, 8%, 3% y 13% de los hallados en hígado (esta comparación se realizó utilizando las bandas inmunoreactivas de muestras de hígado de 1 µg de proteína sembrada).

Los presentes resultados ponen de manifiesto la presencia de CYP2E1, a diferentes niveles de expresión, en PFC, NAc y VTA. Además, constituyen el primer estudio comparativo de la expresión constitutiva de la isoforma CYP2E1, mediante *Western blot*, en diferentes zonas del sistema MCLD.

4.1.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión del CYP2E1 en el sistema mesocorticolímbico (NAc, VTA y PFC) del cerebro de rata

El CYP2E1 es ampliamente conocido por ser fácilmente inducible por el etanol en diversos territorios orgánicos, sin embargo existe una escasez de datos en relación a su inducción en el sistema MCLD. Por ello, en el presente experimento, se evaluó el efecto del tratamiento repetido con etanol en los niveles de expresión del enzima en las mismas áreas estudiadas en el experimento 1.

Como puede observarse en la Figura 4.6, el protocolo empleado para realizar el tratamiento crónico con etanol, fue capaz de incrementar los niveles de expresión de CYP2E1 a nivel hepático hasta un valor de aproximadamente el 157 %, del observado en el grupo control, mostrando así la efectividad del protocolo utilizado.

Los resultados obtenidos con las muestras cerebrales también mostraron la existencia de un fenómeno de inducción, aunque éste se expresó de modo diferenciado en función de la región analizada, tal y como puede observarse

en la Figura 4.7. El tratamiento crónico con etanol fue capaz de elevar los niveles de expresión de CYP2E1 en VTA hasta el 124.69 ± 5.9 % respecto al valor control. También se observó un incremento similar en NAc: la expresión en este caso fue el 124.79 ± 10.1 % de la hallada en el grupo control, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los niveles enzimáticos en PFC tras el tratamiento con etanol.

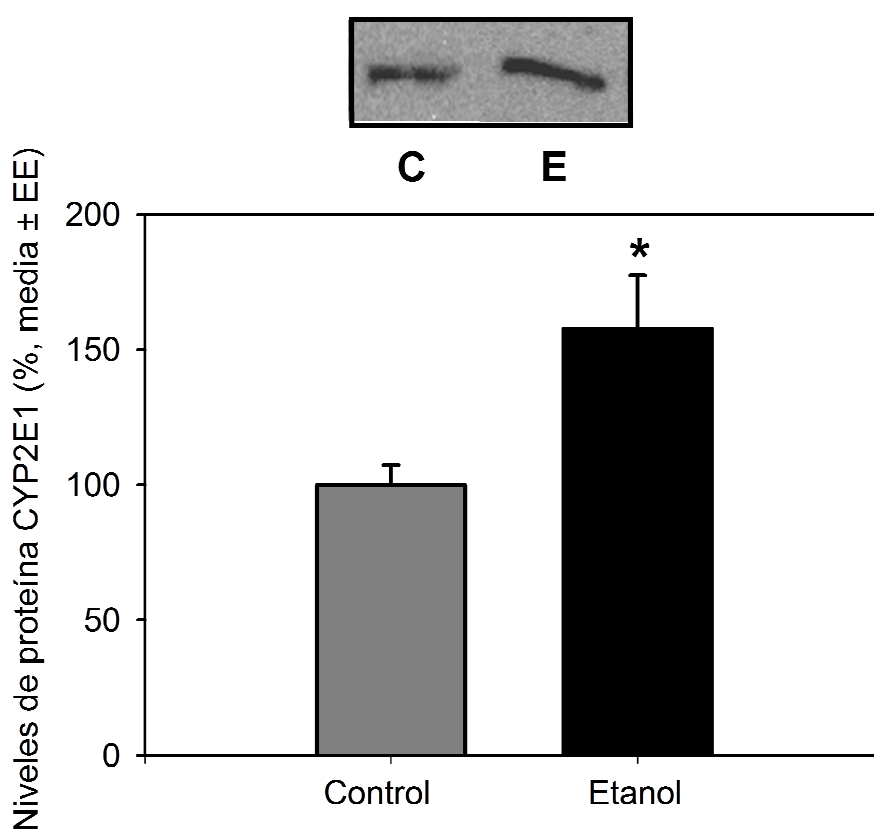


Figura 4.6: Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión de CYP2E1 en hígado de rata. Las barras representan los niveles de CYP2E1 existentes en 1 μ g de proteína procedente de hígado (media \pm EE, n= 4-6). El tratamiento crónico con etanol incrementó significativamente los niveles de CYP2E1. El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$).

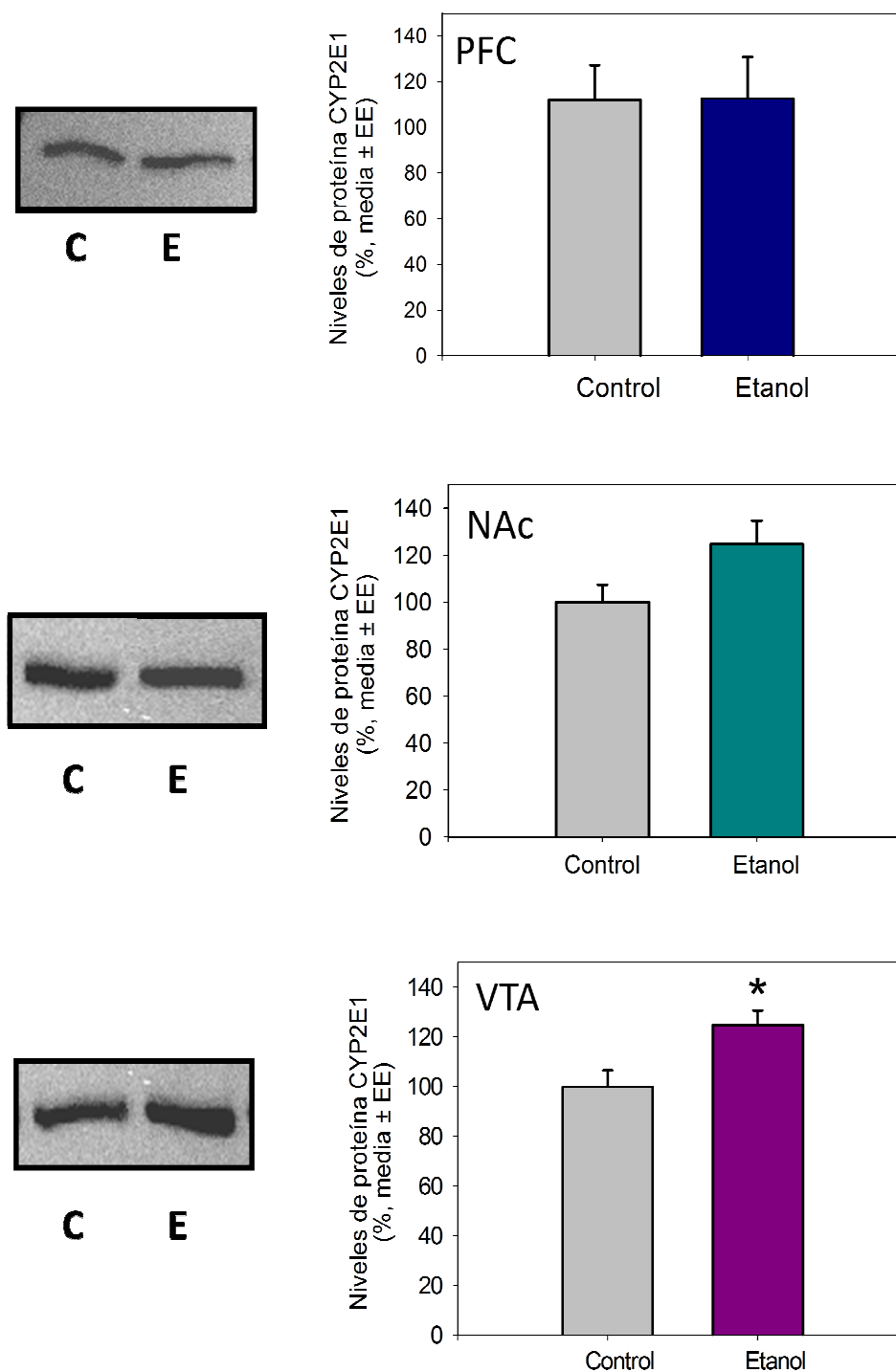


Figura 4.7: Efecto del tratamiento repetido con etanol sobre los niveles de expresión de CYP2E1 en PFC, NAc y VTA. Las barras representan los niveles de CYP2E1 correspondientes a 20, 40 y 30 μ g de proteína procedente de PFC, NAc y VTA, respectivamente (media \pm EE, n= 4-6). El tratamiento crónico con etanol incrementó significativamente los niveles de CYP2E1 en VTA. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Los presentes resultados ponen de manifiesto que el tratamiento crónico con etanol es capaz de producir una inducción del CYP2E1 en el sistema MCLD, aunque de modo dependiente de la región, produciéndose la inducción claramente en VTA.

4.2. ACETALDEHIDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL. PAPEL DEL VTA Y DE LOS RECEPTORES OPIOIDES.

4.2.1. Experimento 3. Efectos de la administración intra-VTAp aguda de etanol o acetaldehído sobre la actividad locomotora de la rata

Validación histológica

Tras el análisis histológico de los animales utilizados en el experimento 3 se procedió a excluir un total de 5 animales: uno perteneciente a cada grupo experimental. La posición del extremo distal de los inyectores en los animales incluidos en el experimento se muestra esquemáticamente en la Figura 4.8.

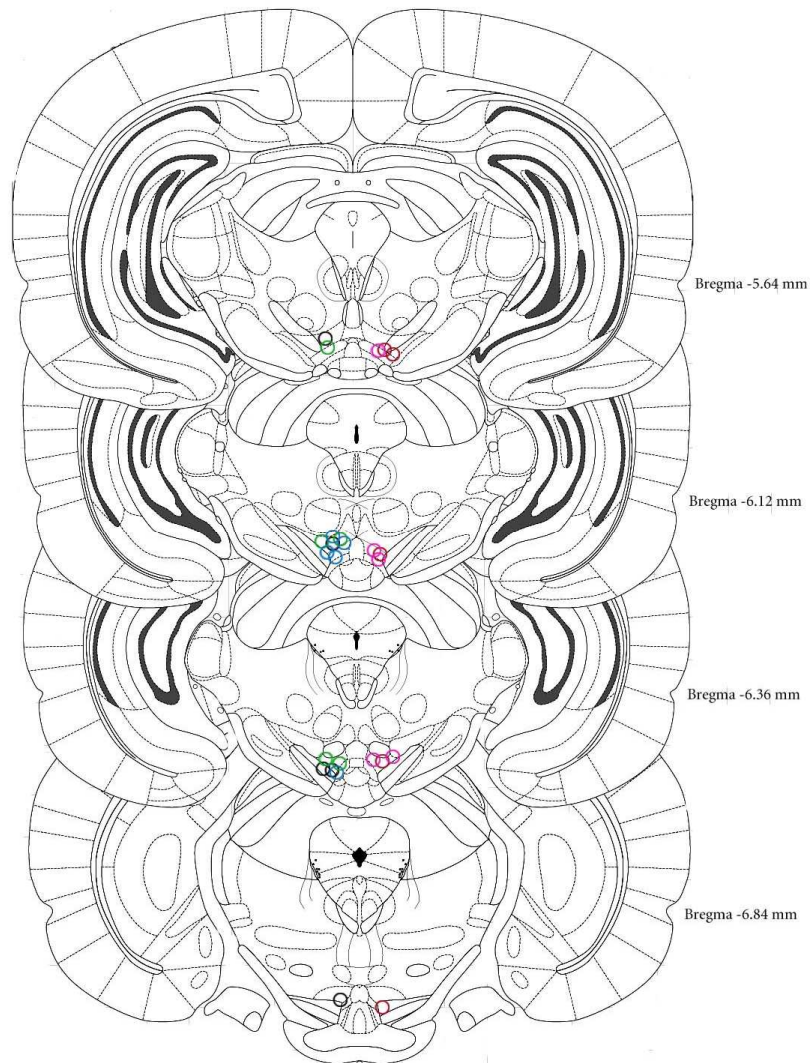


Figura 4.8: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de ratona en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en las ratas empleadas en el experimento 3. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos aCSF (negro) y ACD (25 nmoles-verde, 250 nmoles-azul) se encuentran representados a la izquierda de las secciones, mientras que los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos ETOH (75 nmoles-rosa, 150 nmoles-rojo) se encuentran representados a la derecha de las secciones. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Como puede observarse en la Figura 4.9, nuestros resultados muestran que la administración intra-VTAp aguda de etanol o acetaldehído fue capaz de estimular la locomoción en las ratas. La distancia total recorrida durante los 60 min que duró el ensayo, por los animales que recibieron etanol o acetaldehído fue superior a la recorrida por los animales del grupo control. El análisis estadístico detectó diferencias significativas entre los grupos analizados ($F(4,20)=5.096$, $p=0.005$). La prueba de comparación múltiple evidenció un incremento significativo de la distancia total recorrida en los grupos administrados con las dosis de 250 nmoles de acetaldehído ($p=0.003$) y las dos dosis de etanol ($p=0.033$ para ETOH 75 y $p=0.005$ para ETOH 150), respecto a la mostrada por el grupo de animales que recibieron vehículo.

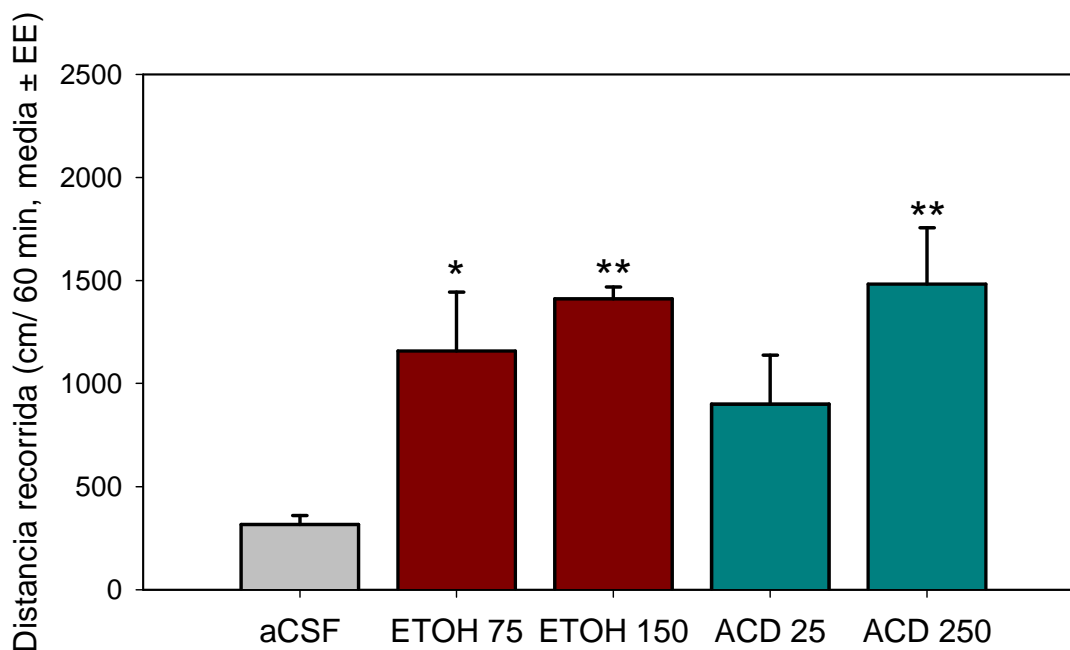


Figura 4.9: Efecto de la administración intra-VTAp de ETOH (75 y 150 nmoles) o ACD (25 y 250 nmoles) sobre la actividad locomotora de las ratas ($n=5$ / grupo). Datos de distancia recorrida en 60 min representados como media \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Los presentes resultados ponen de manifiesto que el etanol y el acetaldehído son capaces de generar activación locomotora cuando se administran directamente en VTAp de ratas Wistar. Además, estos resultados son compatibles con la posibilidad de que el acetaldehído, principal metabolito del etanol, esté implicado en la génesis de los efectos excitatorios del etanol sobre las neuronas DA del VTA.

4.2.2. Experimento 4. Estudio de la implicación de los receptores opioides en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.

Validación histológica

Tras el análisis histológico de los animales utilizados en el experimento 4 se procedió a excluir un total de 4 animales: uno perteneciente a cada grupo experimental. La posición del extremo distal de los inyectores en los animales incluidos en el experimento se muestra esquemáticamente en la Figura 4.10.

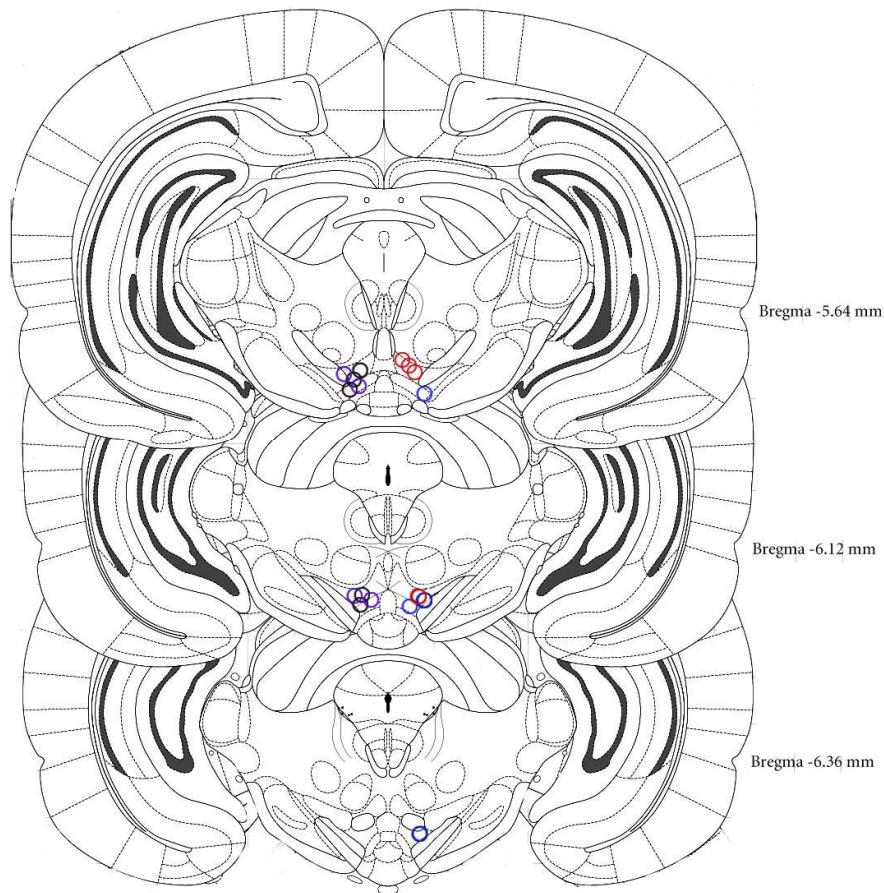


Figura 4.10: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de ratón en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en las ratas empleadas en el experimento 4. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos aCSF (negro) y NTX (morado) se encuentran representados a la izquierda de las secciones, mientras que los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos NTX/ ETOH (rojo) y NTX/ ACD (azul) se encuentran representados a la derecha de las secciones. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Nuestros resultados muestran que la administración intra-VTAp de 13.2 nmoles de naltrexona, fue capaz de prevenir la estimulación de la locomoción inducida por la administración de etanol (150 nmoles) y acetaldehído (250 nmoles), como puede observarse en la Figura 4.11.

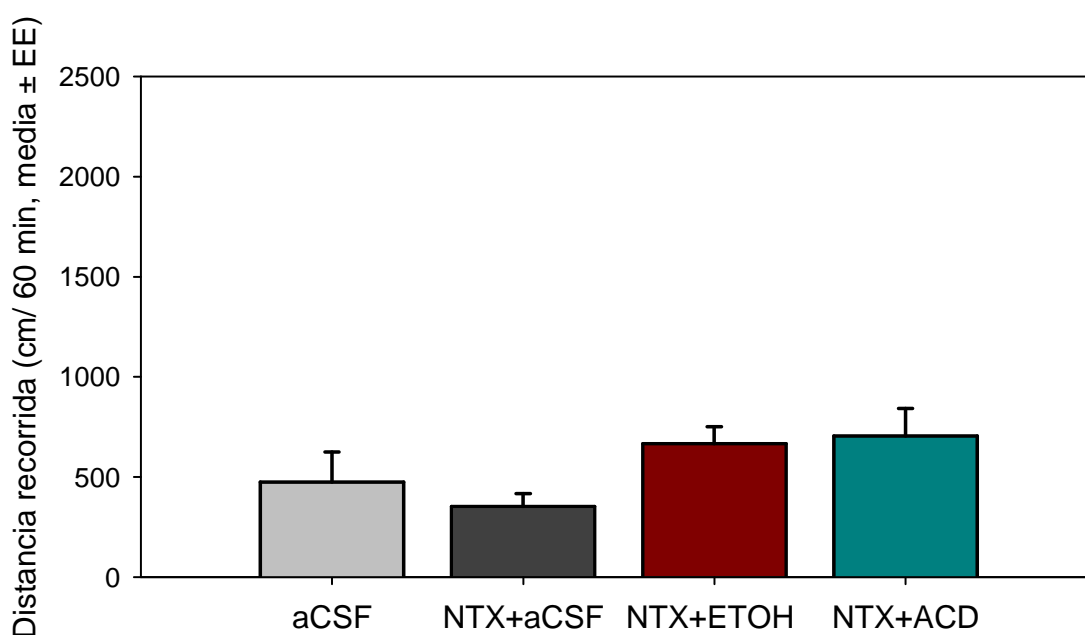


Figura 4.11: Efecto de la administración intra-VTAp de NTX (13.2 nmoles) en la activación locomotora de ratas inducida por ETOH (150 nmoles) o ACD (250 nmoles), (n=4/ grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 60 min están representados como media ± EE. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre grupos.

Las comparación estadística no detectó diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales ($F(3,16)=1.794$; $p=0,198$). Por tanto, los resultados obtenidos en este experimento indican que el bloqueo de los receptores opioides en VTAp es capaz de prevenir la activación locomotora inducida tanto por etanol como por el acetaldehído, tras su administración localizada en VTAp.

4.2.3. Experimento 5. Estudio de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación comportamental derivada de la administración de etanol o acetaldehído.

Experimento 5A: Capacidad de la β -Funaltrexamina para suprimir los efectos activadores producidos por el etanol y el acetaldehído

Validación histológica

Tras el análisis histológico de los cortes histológicos procedentes de los animales utilizados en el experimento 5A se decidió no excluir ninguno de los animales inicialmente incluidos en los grupos experimentales. La posición del extremo distal de los inyectores en los animales incluidos en el experimento se muestra esquemáticamente en la Figura 4.12.

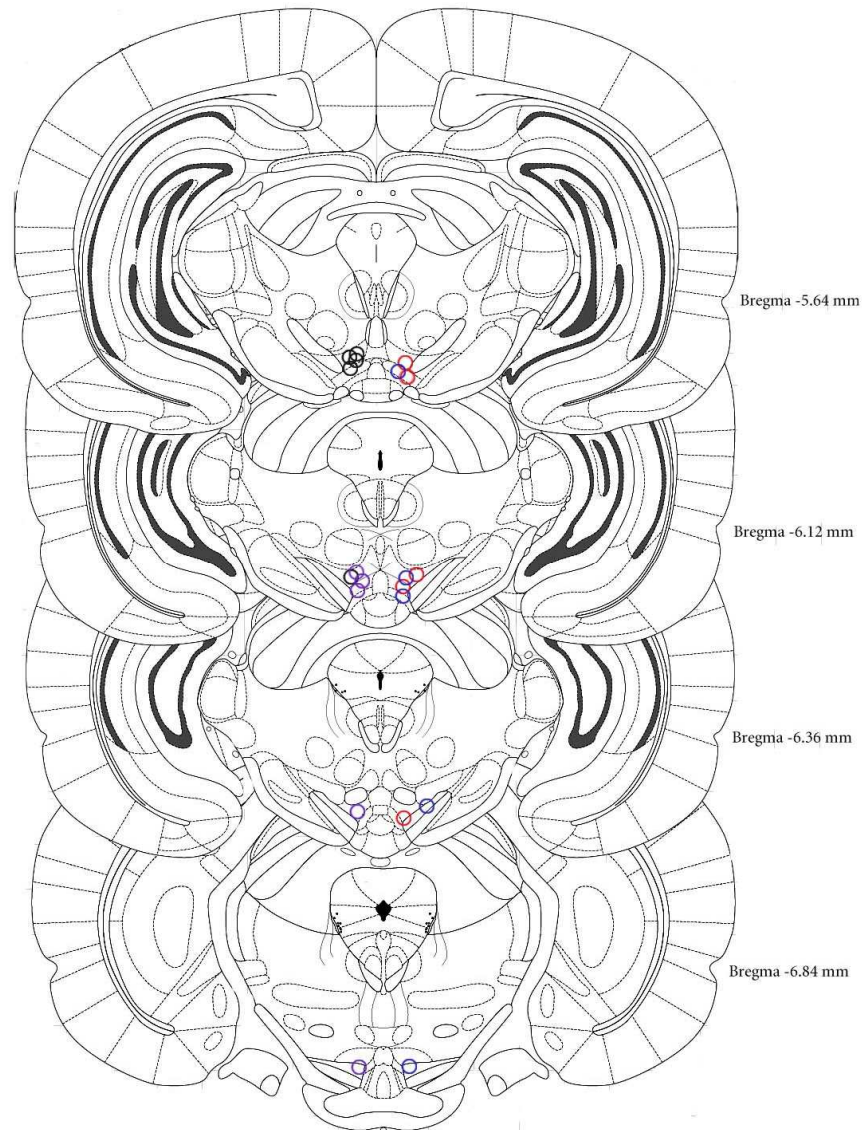


Figura 4.12: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 5B. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos aCSF (negro) y β -FNA (morado) se encuentran representados a la izquierda de las secciones, mientras que los lugares de inyección en los animales pertenecientes al grupo β -FNA /ETOH (rojo) y β -FNA /ACD (azul) se encuentran representados a la derecha de las secciones. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

En la Figura 4.13 puede observarse la distancia total media recorrida por los animales de cada uno de los grupos experimentales empleados en este experimento. Como se aprecia, los resultados muestran que la administración en VTAp de 2.5 nmoles de β -FNA (24 horas antes de la administración de etanol o acetaldehído) y, por lo tanto, el bloqueo específico de los receptores opioides de tipo μ , fue capaz de prevenir la activación motora inducida tanto por el etanol (150 nmoles) como por el acetaldehído (250 nmoles). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los grupos analizados ($F(3,16)=1.828$; $p=0.183$), confirmando así la eficacia preventiva del antagonista opioide.

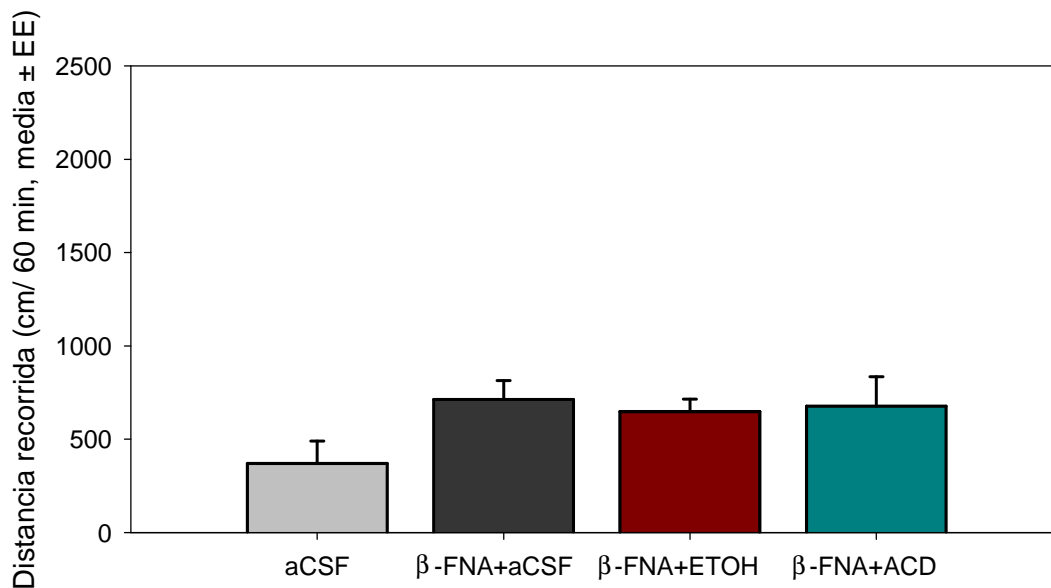


Figura 4.13: Efecto de la administración en VTAp de β -FNA (2.5 nmoles) sobre la activación locomotora inducida por ETOH (150 nmoles) o ACD (250 nmoles) ($n=5$ animales/ grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 60 min están representados como media \pm EE. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre grupos.

Experimento 5B: Eficacia del bloqueo de los receptores opioides μ por la β - Funaltrexamina*Validación histológica*

El análisis histológico de los cortes procedentes de los animales incluidos en el experimento 5B obligó a excluir un total de 4 animales: 1 perteneciente al grupo β -FNA/ aCSF, 2 del grupo β -FNA/ DAMGO y 1 del grupo aCSF. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.14.

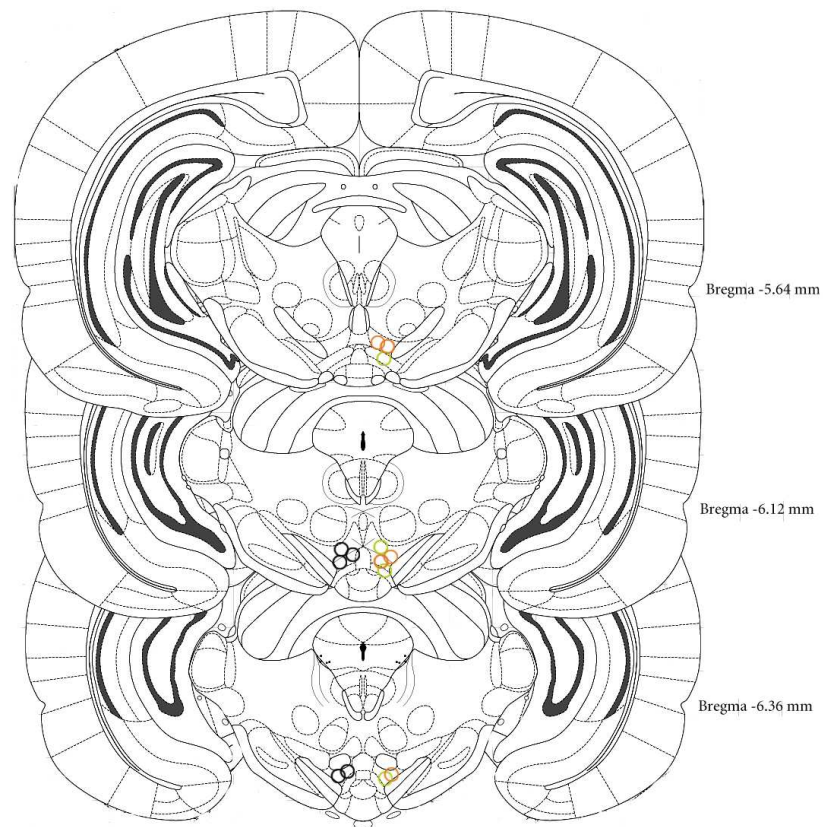


Figura 4.14: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 5B. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección en los animales pertenecientes al grupo aCSF (negro) se encuentran representados a la izquierda de las secciones, mientras que los lugares de inyección en los animales pertenecientes a los grupos DAMGO (verde) y β -FNA/DAMGO (naranja) se encuentran representados a la derecha de las secciones. Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Como se indicó en el capítulo de Materiales y Métodos, en este experimento se procedió a evaluar la eficacia de la dosis de β -FNA seleccionada (2.5 nmoles), así como del protocolo temporal empleado para su administración (24 horas antes de la inyección de etanol o acetaldehído), para bloquear los receptores opioides de tipo μ . Para ello se estudió su eficacia para suprimir los efectos activantes de una microinyección (0.13 nmoles) intra-VTAp de DAMGO, un agonista opioide selectivo de los receptores μ .

Como se aprecia en la figura 4.15, la microinyección de DAMGO fue capaz de incrementar la actividad locomotora de las ratas hasta un 505% con respecto a la mostrada por los controles. La administración en VTAp de β -FNA, 24 horas antes de la administración de DAMGO, redujo la magnitud de la activación motora inducida por el agonista opioide.

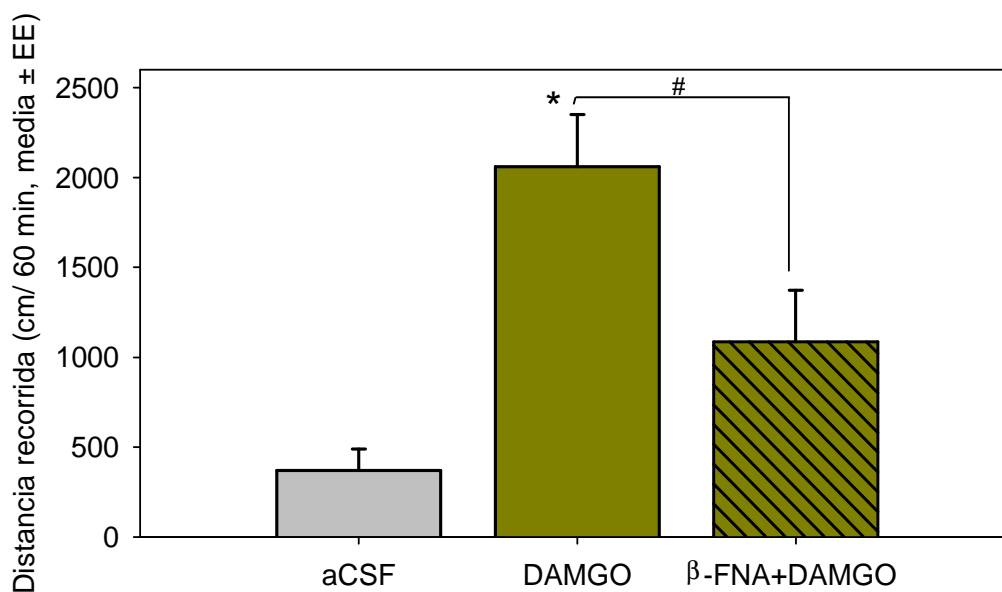


Figura 4.15: Efecto de la administración en VTAp de β -FNA (2.5 nmoles) sobre la actividad locomotora de ratas inducida por DAMGO (0.13 nmoles) (n= 4-5 animales/ grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 60 min están representados como media \pm EE. El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo control (p= 0.002) y la almohadilla entre grupos (p= 0.016).

El análisis estadístico confirmó las anteriores afirmaciones. El ANOVA de una vía mostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados ($F(2,10)=12.933$, $p=0.002$). Del mismo modo, la prueba de Tukey evidenció que la distancia recorrida por los animales del grupo DAMGO fue significativamente diferente de la observada en el grupo control ($p=0.001$) y del grupo β -FNA/ DAMGO ($p=0.016$), mientras que la distancia recorrida por los animales tratados con β -FNA/ DAMGO no difirió significativamente de la obtenida en el grupo control ($p=0.383$), demostrando la eficacia del protocolo experimental empleado para el bloqueo de los receptores opioides de tipo μ en el VTAp.

4.2.4. Experimento 6. Efectos de la D-penicilamina sobre la activación locomotora inducida por etanol

Experimento 6A: Efecto de la administración sistémica de D-penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol

Validación histológica

El análisis histológico de los cortes procedentes de los animales incluidos en el experimento 6A obligó a excluir un total de 4 animales: 1 perteneciente al grupo DP 12.5/ ETOH, 1 del grupo DP 25/ ETOH, 1 del grupo DP 50/ aCSF y 1 del grupo DP 50/ ETOH. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.16.

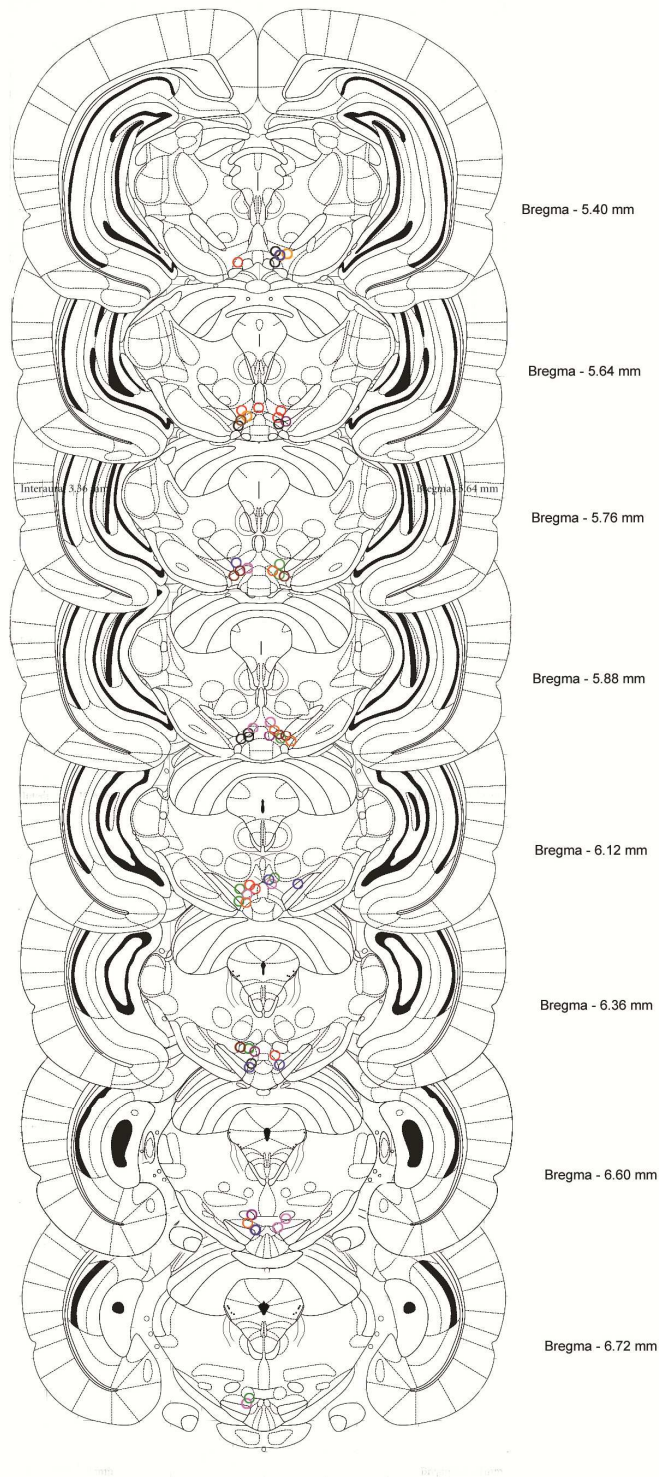


Figura 4.16: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de las cánulas empleadas en el experimento 6A. Los grupos experimentales fueron: DP 0/ aCSF (negro), DP 0/ ETOH (rojo), DP 12.5/ aCSF (verde), DP 12.5/ ETOH (azul), DP 25/ aCSF (rosa), DP 25/ ETOH (morado), DP 50/ aCSF (marrón) y DP 50/ ETOH (naranja). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Como era de esperar, en base a los experimentos previamente mostrados, la administración de 150 nmoles de etanol en VTAp aumentó significativamente la actividad locomotora de las ratas en relación a la obtenida en los animales del grupo control (Figura 4.17). El pretratamiento por vía i.p. con DP, un agente secuestrante del acetaldehído, fue capaz, aparentemente, de suprimir el incremento de la actividad locomotora inducido por el etanol. Además, dicha supresión parece producirse de modo dosis-dependiente.

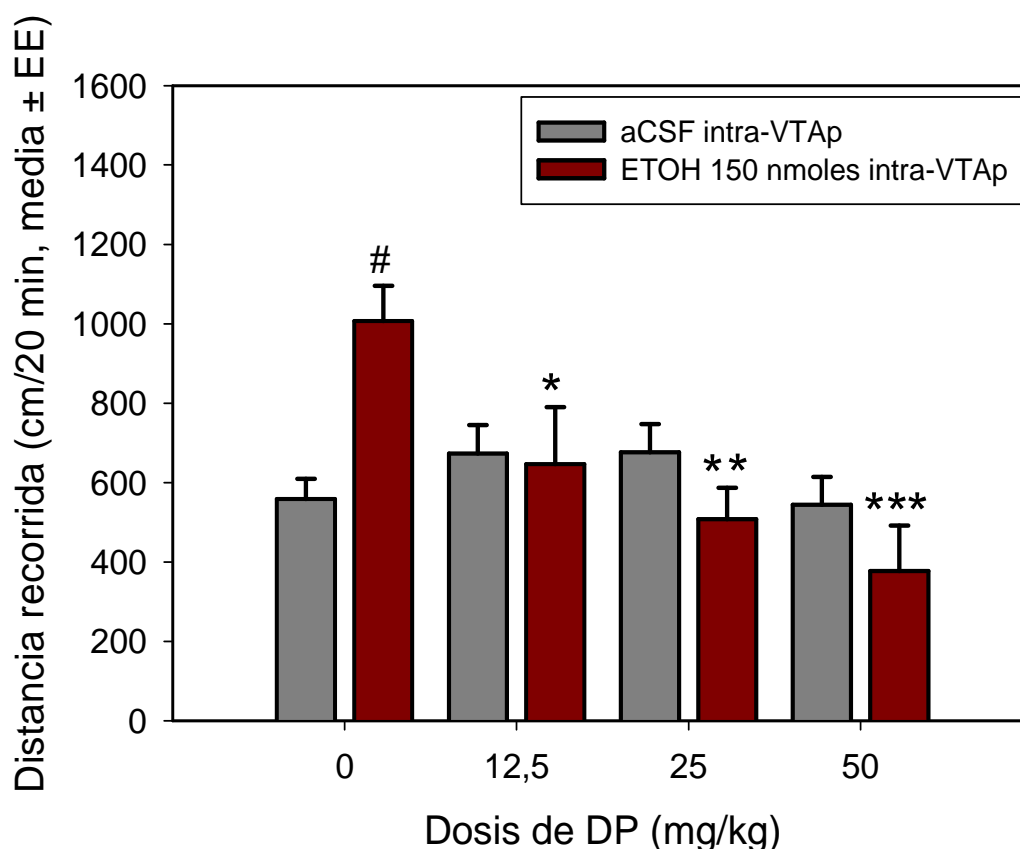


Figura 4.17: Efecto de la administración i.p. de diferentes dosis de DP (0, 12,5, 25 y 50 mg/kg), 30 minutos antes de la administración intra-VTA de aCSF o ETOH (150 nmoles) sobre la actividad locomotora de las ratas. Los datos de distancia recorrida en 20 min están representados como media \pm EE (n= 7-8 animales/ grupo). El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre grupos. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en el grupo de animales DP 0/ ETOH (*p< 0.05; **p= 0.001; ***p< 0.0001). La almohadilla indica diferencias significativas respecto a su respectivo grupo aCSF (p \leq 0.01).

El análisis estadístico de los resultados de este experimento mostró la existencia de diferencias significativas para el efecto principal, dosis de DP, ($F(3, 52) = 4.63$; $p = 0.006$) y para la interacción ($F(3,52) = 5.69$; $p = 0.002$). El análisis de los efectos principales, mostró una reducción significativa en la actividad locomotora de los animales pretratados DP a las tres dosis ensayadas: DP 12.5 mg/ kg ($p = 0.035$), DP 25 mg/ kg ($p = 0.001$) y DP 50 mg/ kg ($p < 0.001$) respecto a los animales pretratados con salino i.p. (dosis de DP 0 mg/ kg en la figura). Cabe destacar que el análisis no detectó diferencias significativas entre la distancia media recorrida en los animales microinyectados con aCSF para las distintas dosis de DP administradas, lo que indica que la administración de DP no deprime *per se* la actividad motora de los animales.

La inspección de la Figura 4.17 sugiere también que la distancia recorrida por los animales del grupo DP 50/ ETOH tiende a ser inferior a la obtenida en los animales del grupo DP 50/ aCSF, un hecho también observable cuando la dosis de DP fue 25 mg/kg. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos no detectó diferencias significativas entre estos valores ($p = 0.201$).

Experimento 6B: Efecto de la administración sistémica de la D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de DAMGO

Validación histológica

El análisis histológico de los cortes procedentes de los animales incluidos en el experimento 6B obligó a excluir tan sólo un animal perteneciente al grupo DP50/ DAMGO. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.18.

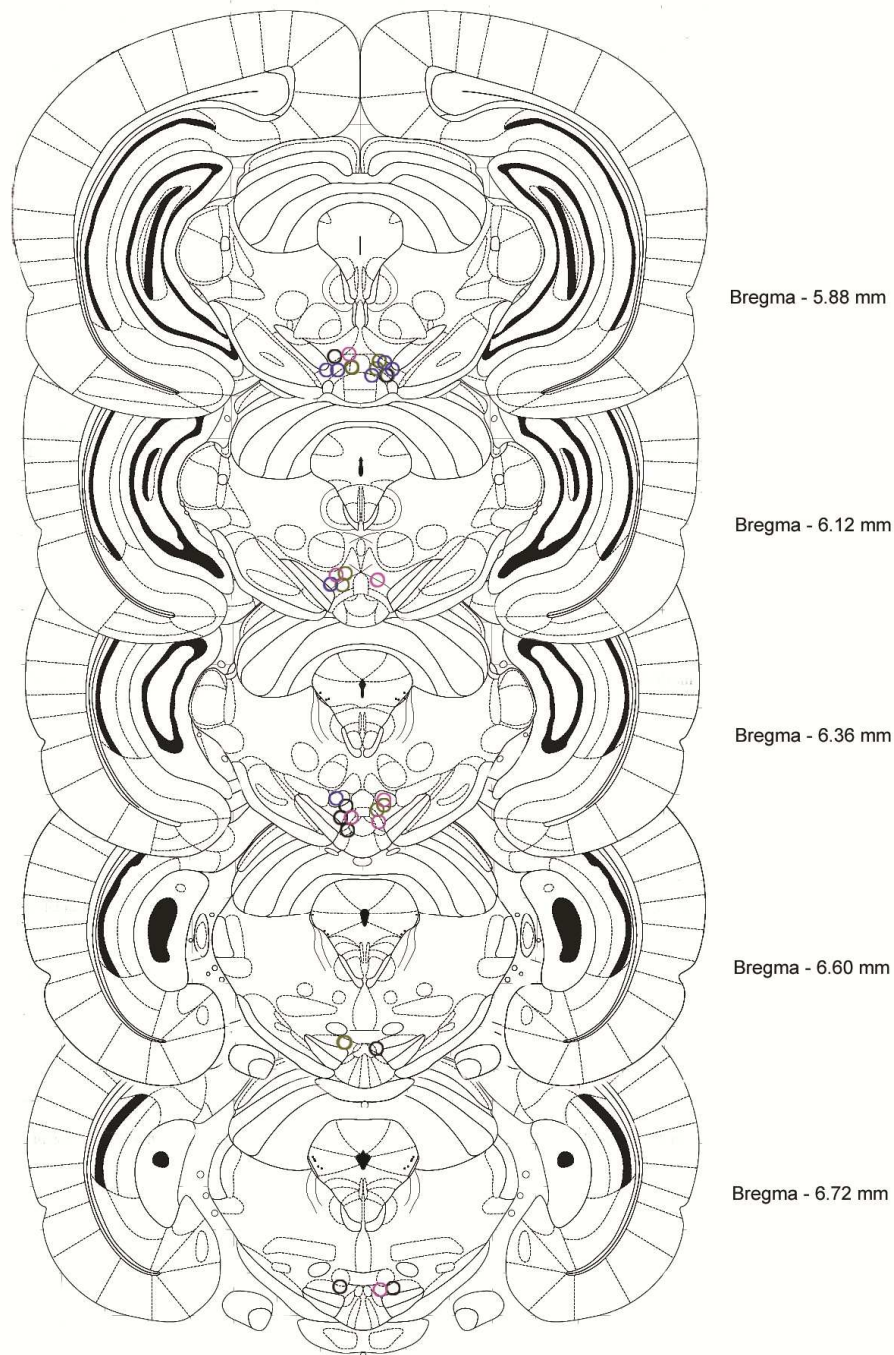


Figura 4.18: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de ratón en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 6B. Los grupos experimentales son: DP 0/ aCSF (negro), DP 0/ DAMGO (verde), DP 50/ aCSF (azul) y DP 50/ DAMGO (rosa). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Como se aprecia en la figura 4.19, la administración de 0.013 nmoles de DAMGO en VTAp aumentó de modo notable la actividad locomotora de las ratas, por encima del 218%, respecto a lo observado en los animales de los grupos control. Además, la inyección i.p. de DP (50 mg/ kg) 30 minutos antes de la administración intra-VTAp de DAMGO no pareció afectar la activación motora inducida por este agonista selectivo de los receptores opioides de tipo μ .

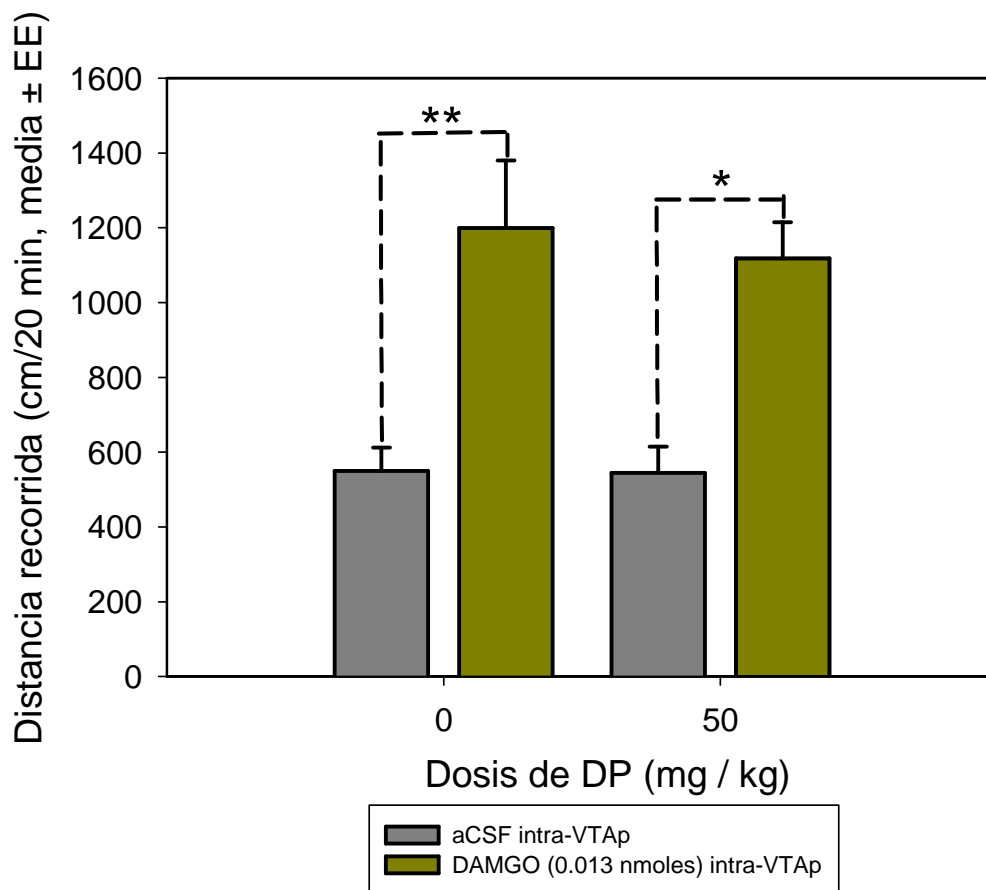


Figura 4.19: Efecto de la administración i.p. de DP (0 y 50 mg/ kg), 30 minutos antes de la administración intra-VTAp de 0.013 nmoles de DAMGO sobre la actividad locomotora de las ratas. Los datos de distancia recorrida durante los 20 min están representados como media \pm EE (n= 7-8 animales/ grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente (*p= 0.002; **p< 0.001).

El ANOVA de dos vías mostró la existencia de diferencias significativas para el efecto principal. El análisis de los efectos principales, corroboró el aumento significativo en la distancia recorrida por las ratas del grupo DP 0/ DAMGO con respecto a la obtenida en los animales del grupo DP 0/ aCSF ($F(1, 26) = 16.623$; $p < 0.001$), así como en los animales del grupo DP 50/ DAMGO con respecto a la obtenida en los del grupo DP 50/ aCSF ($F(1, 26) = 11.354$; $p = 0.002$), confirmando así la selectividad de acción de la DP. Además, el análisis no detectó diferencias significativas entre los animales de los grupos DP 0/ DAMGO y DP 50/ DAMGO ($F(1, 26) = 0.240$; $p = 0.628$), ni tampoco entre los animales del grupo DP 0/ aCSF con respecto a los del grupo DP 50/ aCSF ($F(1, 26) = 0.001$; $p = 0.976$).

4.2.5. Experimento 7. Efectos del etanol a bajas dosis sobre la actividad locomotora en presencia de D-penicilamina

Experimento 7A: Efecto de la administración aguda intra-VTA de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora

Validación histológica

Ninguno de los animales inicialmente incluidos en este experimento 7A fue excluido tras el análisis histológico de los cortes cerebrales. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales utilizados en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.20.

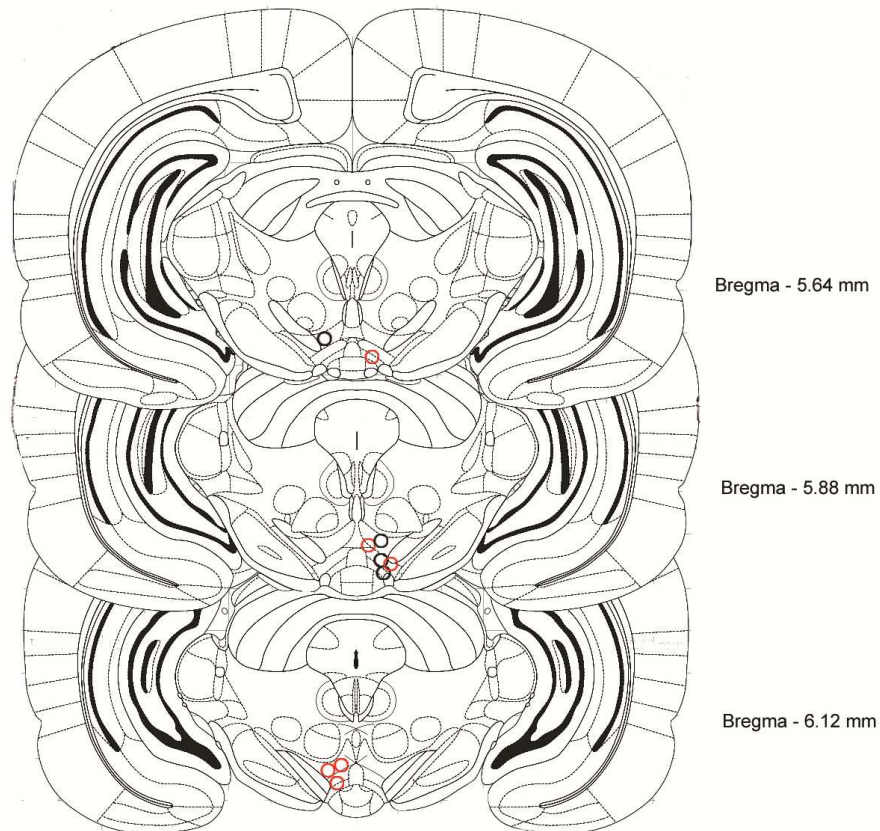


Figura 4.20: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 7A. Los grupos experimentales son: grupo aCSF (negro) y grupo ETOH 35 (rojo). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Nuestros resultados muestran que la administración intra-VTAp aguda de 35 nmoles de etanol no fue capaz de producir efectos estimulantes locomotores en las ratas. En la Figura 4.21 puede observarse la distancia total media recorrida durante el ensayo de actividad por los animales de los dos grupos experimentales. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los valores obtenidos para ambos grupos ($p= 0.963$).

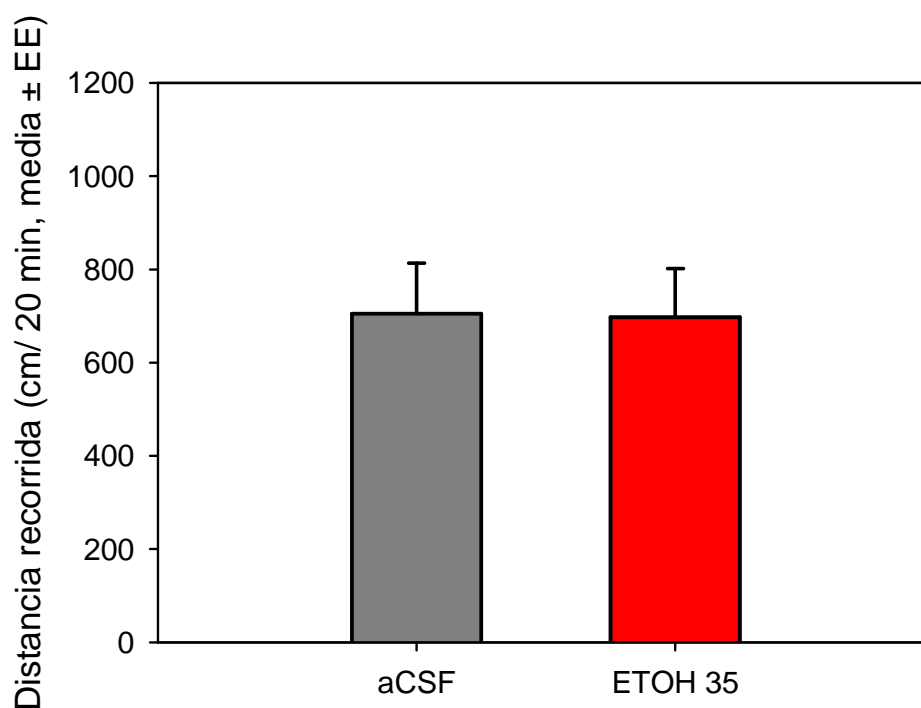


Figura 4.21: Efecto de la administración intra-VTAp de ETOH (35 nmoles; $n=6$) y aCSF ($n=4$) sobre la actividad locomotora de las ratas. Los datos de distancia recorrida durante los 20 min están representados como media \pm EE. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas.

Experimento 7B: Efecto de la administración aguda intra-VTAp de bajas dosis de etanol sobre la actividad locomotora en presencia de D-Penicilamina

Validación histológica

El análisis histológico de los cortes procedentes de los animales inicialmente incluidos en este experimento obligó a excluir tan sólo un animal perteneciente al grupo DP50. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.22.

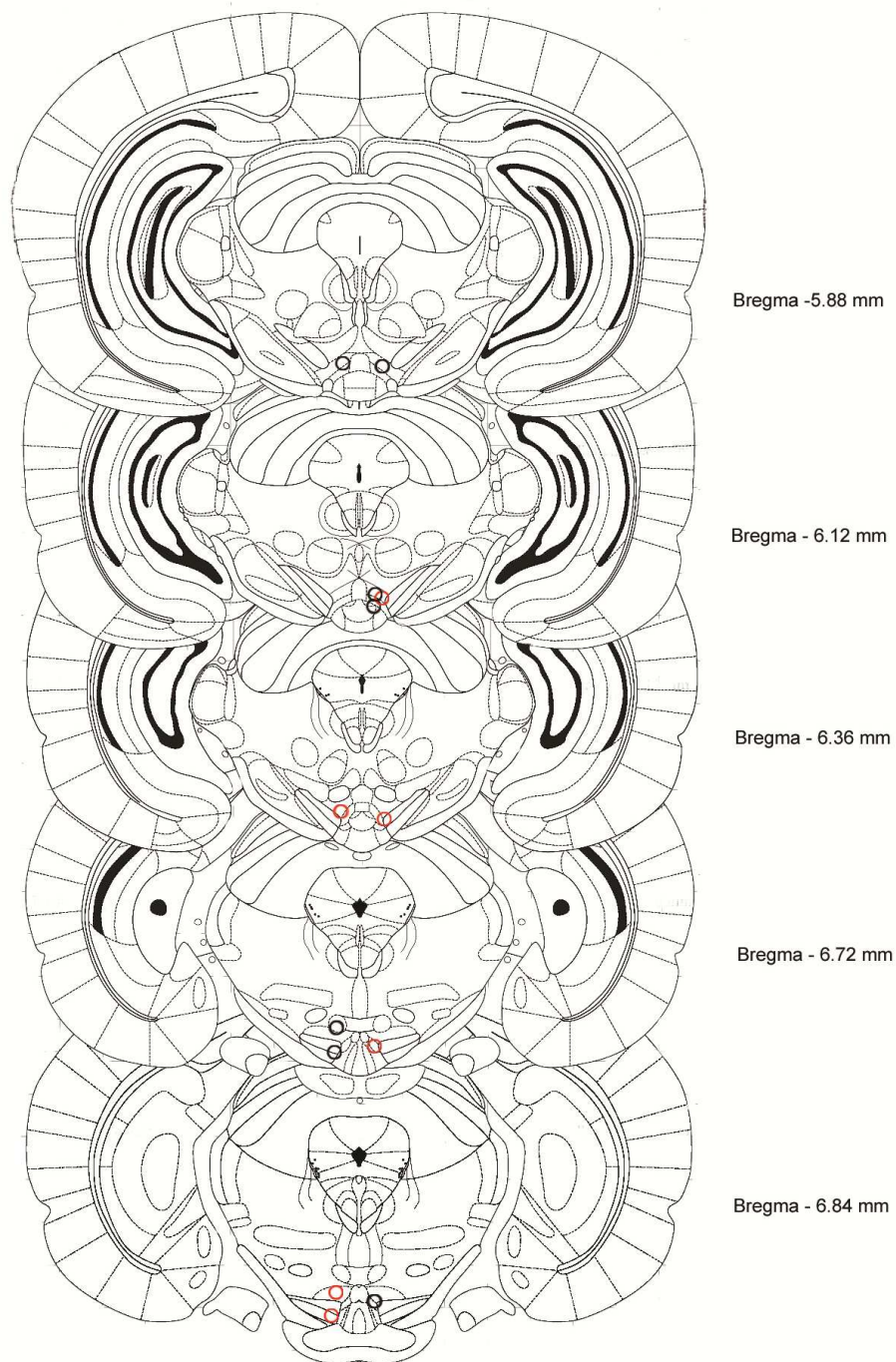


Figura 4.22: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 7B. Los grupos experimentales son: grupo DP 0 (negro) y grupo DP 50 (rojo). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

En la Figura 4.23 pueden observarse los resultados de este experimento. Como se aprecia, la distancia total recorrida durante el ensayo (20 min) por los animales tratados con 35 nmoles de etanol fue claramente inferior a la recorrida por los animales control, indicando que el etanol administrado a estas dosis bajas en presencia de DP ejerce un efecto depresor sobre la actividad motora de los animales. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre las medias obtenidas en ambos grupos ($p= 0.0041$).

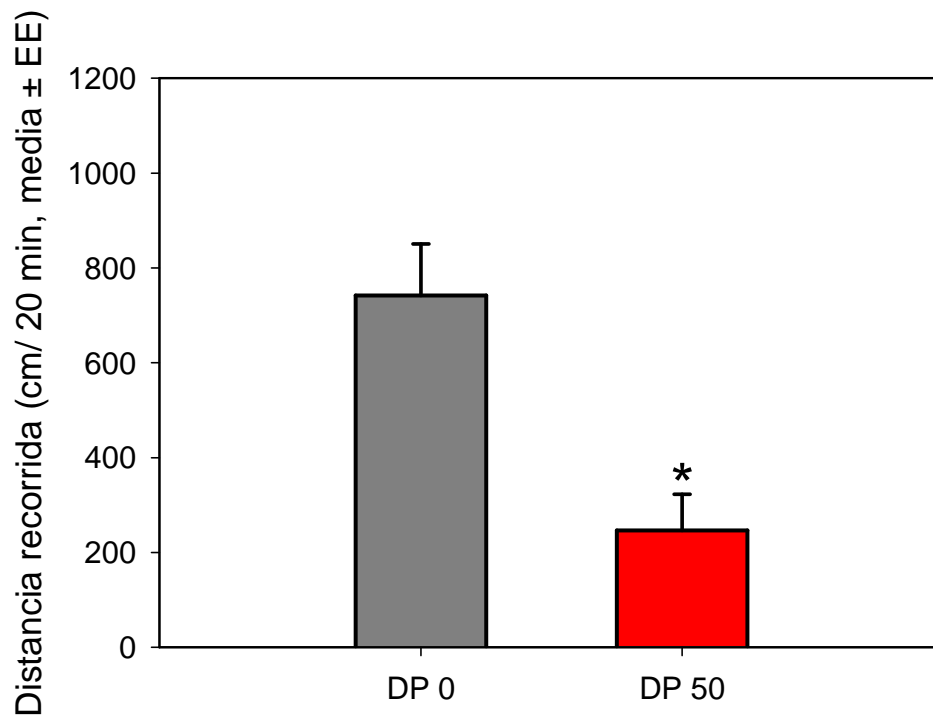


Figura 4.23: Efecto de la administración intra-VTAp de ETOH (35 nmoles) sobre la actividad locomotora de las ratas en ausencia (DP 0) o presencia (DP 50) de DP, administrada intraperitonealmente a la dosis de 50 mg/kg, 30 minutos antes de la microinyección cerebral (n=6-7 animales/ grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 20 min están representados como media \pm EE. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre grupos. El asterisco indica diferencias significativas entre grupos ($p= 0.0041$).

4.2.6. Experimento 8. Estudio de los fenómenos de sensibilización y/o tolerancia comportamental tras la administración repetida intra-VTA de etanol

Experimento 8A: Protocolo de administración 1. Estudios con etanol.

Validación histológica

El análisis histológico obligó a excluir 2 animales pertenecientes al grupo aCSF de este experimento. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.24.

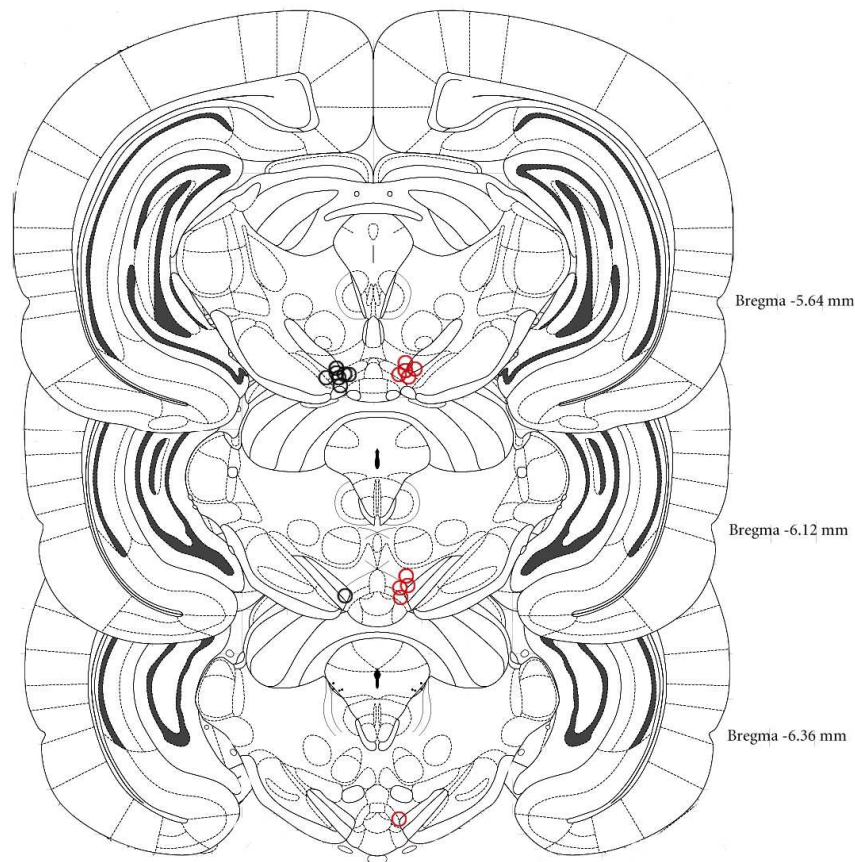


Figura 4.24: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 8A. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección en los animales pertenecientes al grupo aCSF se encuentran representados a la izquierda de las secciones (negro), mientras que los lugares de inyección de los animales pertenecientes al grupo ETOH se encuentran representados a la derecha de las secciones (rojo). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

Como se aprecia en la figura 4.25, la administración intra-VTAp repetida de 150 nmoles de etanol, siguiendo el protocolo de administración 1, condujo a una aparente reducción de la respuesta motora de los animales, lo que en principio indicaría la aparición de tolerancia al efecto activante del etanol. El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas para los factores tiempo (sesión experimental) ($F(3, 42) = 5.647, p = 0.002$) y tratamiento ($F(1, 14) = 6.657, p = 0.022$) y para la interacción tiempo x tratamiento ($F(3, 42) = 4.291, p = 0.010$). El análisis de los efectos principales detectó diferencias entre las distancias medias recorridas en la 1ª y 2ª sesión experimental de los animales tratados con etanol respecto a los tratados con vehículo ($p = 0.004$ y $p = 0.037$, respectivamente), mientras que en la 3ª y 4ª sesión experimental no hubieron diferencias significativas entre los animales tratados con etanol y sus correspondientes controles ($p = 0.464$ y $p = 0.218$, respectivamente). Es decir, a partir de la 2ª dosis, el etanol ya no fue capaz de producir activación motora en este protocolo de administración.

El análisis estadístico también mostró que la actividad de los animales tratados con vehículo no se alteró significativamente a lo largo del tiempo ($p = 1$ para todas las sesiones experimentales respecto a la 1ª), lo que permite descartar que la reducción en la activación inducida por el etanol a lo largo de las sesiones pudiera ser debida a fenómenos ajenos al desarrollo de tolerancia farmacológica.

La reducción en la respuesta activante del etanol se manifestó a partir de la 2ª administración, y se mantuvo significativa hasta la 4ª sesión experimental ($p = 0.036, p = 0.015$ y $p = 0.033$, respectivamente, para las sesiones 2ª, 3ª y 4ª).

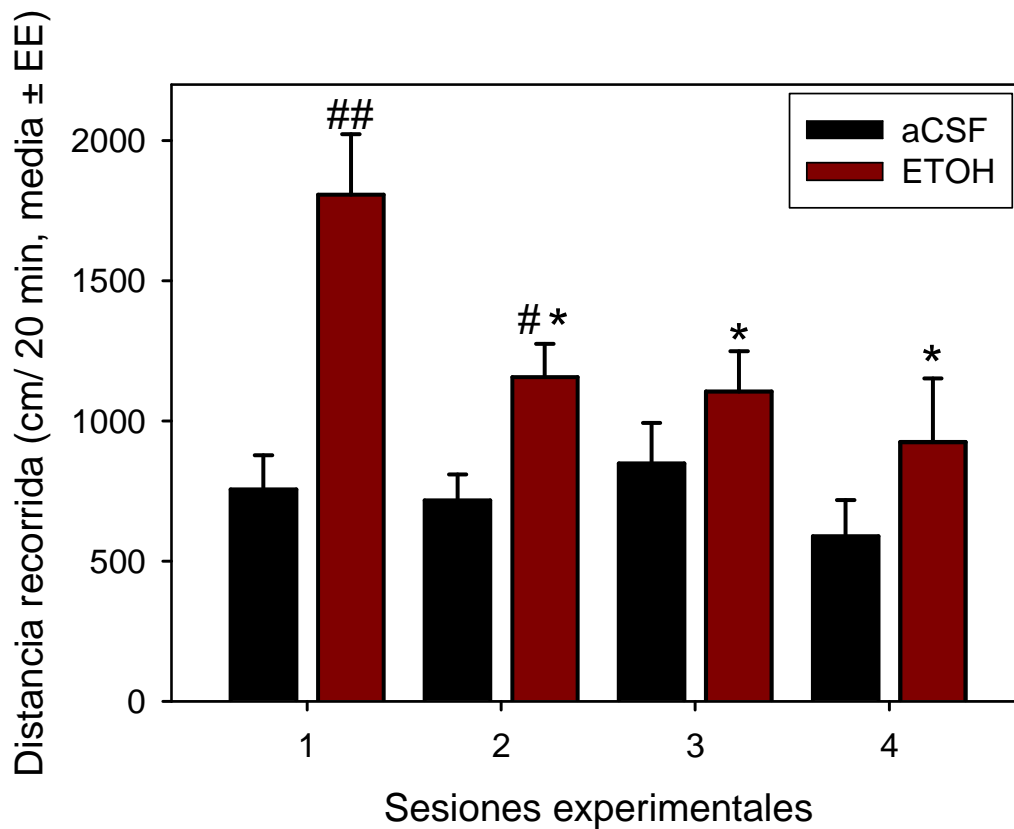


Figura 4.25: Efecto de la administración repetida de 150 nmoles de etanol en VTAp siguiendo el protocolo de administración 1 sobre la actividad locomotora de las ratas ($n= 8-10$ animales/grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 20 min están representados como media \pm EE. Las almohadillas indican diferencias entre grupos para cada sesión experimental (# $p < 0.05$; ## $p = 0.004$), y los asteriscos indican diferencias respecto a la 1ª sesión experimental del grupo ETOH (* $p < 0.05$). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas a lo largo de las sesiones experimentales para el grupo control.

Experimento 8B: Protocolo de administración 1. Estudios con DAMGO.*Validación histológica*

Todos los animales inicialmente incluidos en el experimento 8B superaron el análisis histológico de posicionamiento de los inyectores. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.26.

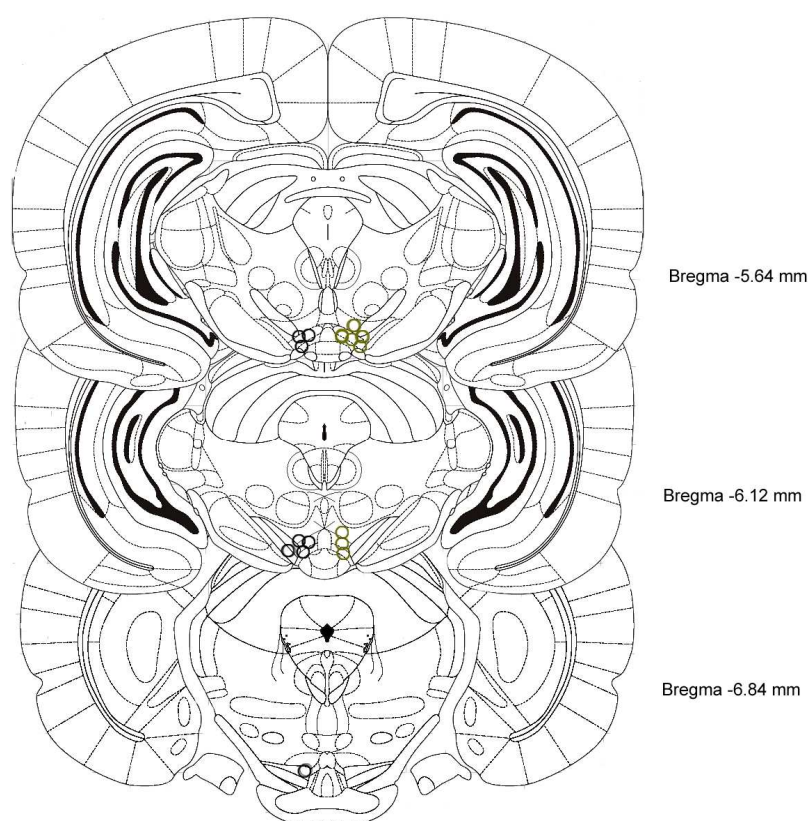


Figura 4.26: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 8B. Para facilitar la inspección de la figura, los lugares de inyección de los animales del grupo control se encuentran representado a la izquierda de las secciones (negro), mientras que los lugares de inyección de los animales pertenecientes al grupo DAMGO se encuentran representados a la derecha de las secciones (verde). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson (Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

La figura 4.27 muestra que la administración repetida en VTAp de 0.13 nmoles de DAMGO, un agonista opioide selectivo de los receptores opioides de tipo μ , siguiendo el protocolo 1, es capaz de producir activaciones motoras en las ratas que, aparentemente, aumentaron en intensidad con el transcurso de las sesiones experimentales, sugiriendo la posibilidad de una sensibilización motora. El análisis estadístico permitió detectar diferencias significativas para los factores tiempo ($F(3, 39) = 12.980, p < 0.001$) y tratamiento ($F(1, 13) = 47.077, p < 0.01$) y para la interacción tiempo x tratamiento ($F(3, 39) = 11.390, p < 0.001$). El análisis de efectos simples demostró la existencia de diferencias significativas entre las distancias recorridas por los animales tratados con DAMGO en relación a los tratados con vehículo, siendo este efecto muy evidente en las sesiones 2^a, 3^a y 4^a ($p = 0.03, p = 0.001$ y $p = 0.001$, respectivamente). Como ocurrió en el experimento anterior, los valores de actividad en los animales tratados con vehículo no difirió significativamente entre las distintas sesiones experimentales ($p = 1$ para todas las sesiones experimentales respecto a la 1^a).

Además, el análisis estadístico demostró que la activación inducida por DAMGO aumentó en intensidad con el paso del tiempo, siendo significativas las diferencias, no sólo en relación a la obtenida en la 1^a sesión, ($p = 0.004$ y $p < 0.001$, respectivamente, para las sesiones 3^a y 4^a) sino también en relación a la 2^a, ($p < 0.001$ para ambas).

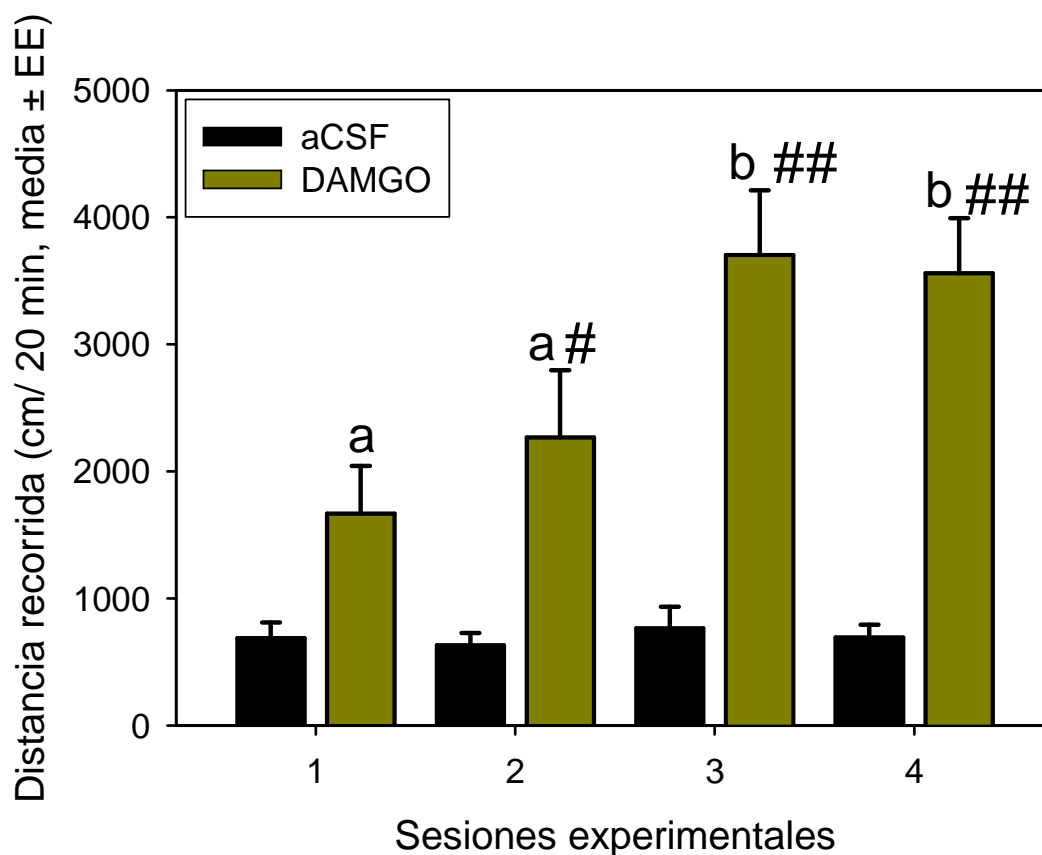


Figura 4.27: Efecto de la administración repetida en VTAp, siguiendo el protocolo 1, de 0.13 nmoles de DAMGO sobre la actividad motora de las ratas ($n=8$ animales/ grupo). Los datos de distancia recorrida durante los 20 min están representados como media \pm EE. Las almohadillas indican diferencias entre grupos para cada sesión experimental (# $p < 0.05$; ## $p < 0.001$), y las distintas letras indican diferencias entre sesiones experimentales. Para el grupo control no se obtuvieron diferencias a lo largo de las sesiones experimentales.

Experimento 8C. Protocolo de administración 2. Estudios con etanol.*Validación histológica*

El tamaño final de los grupos experimentales pertenecientes a este experimento se vio reducido del valor inicial de $n=15$ a un valor de $n=9$ para el grupo aCSF y de $n=13$ para el grupo ETOH. A diferencia de lo ocurrido en los anteriores experimentos, las causas que motivaron esta reducción fueron 2: incorrecta posición de los inyectores revelada en el examen histológico (2 de los 6 excluidos en el grupo aCSF y 1 de 2 del grupo ETOH) y pérdida en la viabilidad de las cánulas, ocasionada por el desprendimiento del cemento de fijación, en los restantes casos. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la Figura 4.28.

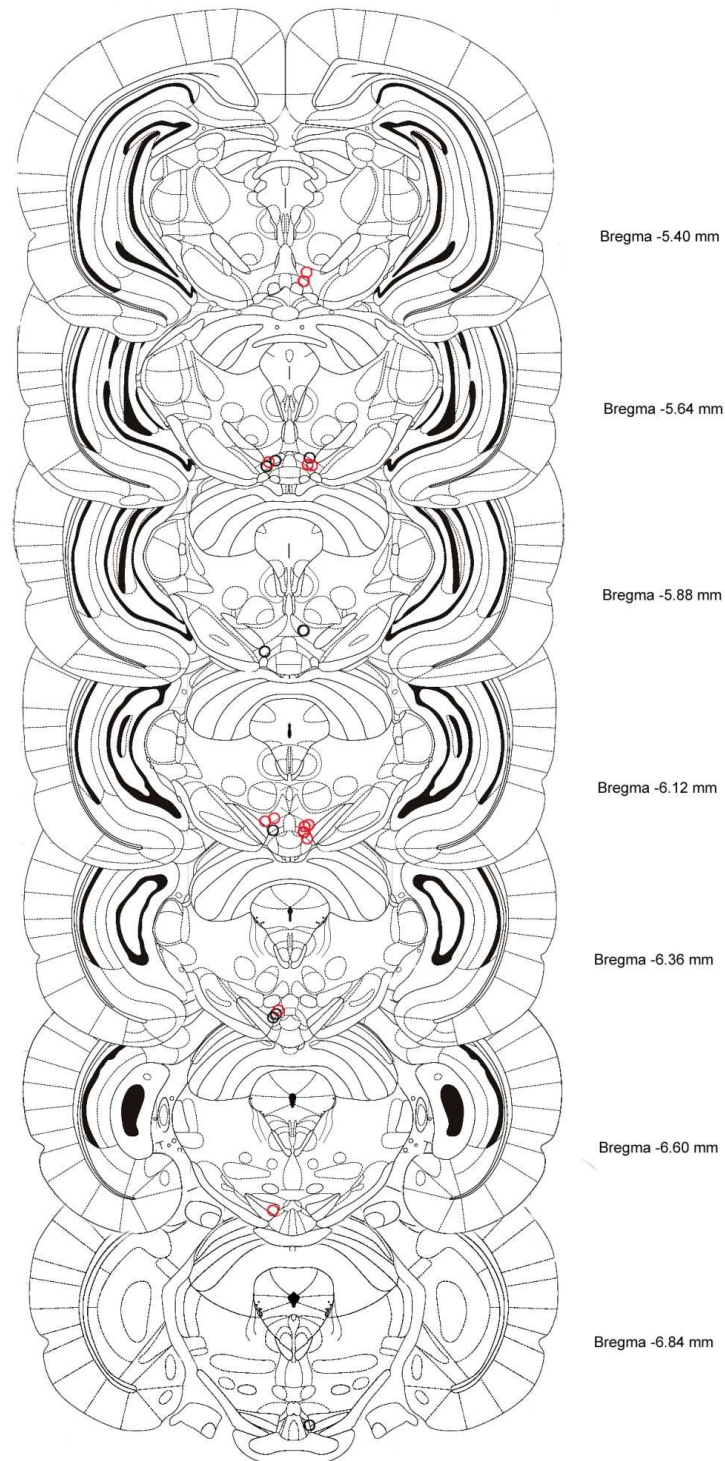


Figura 4.28: Diagramas correspondientes a secciones coronales del cerebro de rata en los que se señalan con círculos de diferente color (según el grupo experimental) la posición del extremo distal de los inyectores en los animales empleados en el experimento 8C. Los diferentes grupos experimentales son: grupo aCSF (negro) y grupo ETOH (rojo). Los números indican la distancia antero-posterior respecto a bregma. Adaptado del Paxinos y Watson. 2007).

Evaluación de la actividad locomotora

En la Figura 4.29 puede observarse la distancia media total recorrida por los animales pertenecientes a los dos grupos experimentales utilizados en este experimento. Como se aprecia, los valores medios de actividad motora disminuyeron a lo largo del experimento para los animales tratados con etanol, pasando de un valor de distancia recorrida en la sesión 1ª de 1102 ± 75 cm (media \pm EE) a un valor de 545 ± 68 cm (media \pm EE) en la 7ª sesión, lo cual supuso una reducción del 50%.

Este efecto también fue evidente en el grupo control tratado repetidamente con vehículo. Si la actividad motora media en este grupo fue de 752 ± 50 cm (media \pm EE) en la 1ª sesión, la actividad se redujo hasta 462 ± 39 cm (media \pm EE) en la última (porcentaje de reducción del 39%).

También es aparente, tras la inspección de la figura, que la administración de etanol fue capaz de activar a los animales, sobre todo en las primeras sesiones experimentales, mientras que el nivel de estimulación locomotora disminuyó en las últimas sesiones, hasta alcanzar prácticamente el mismo nivel de actividad que el mostrado por el grupo control en la 7ª sesión experimental.

El análisis estadístico de los resultados confirmó estas observaciones. El ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró diferencias significativas para los factores tiempo (sesión experimental) ($F(6, 120) = 17.905$, $p < 0.001$) y tratamiento ($F(1, 20) = 6.392$, $p = 0.020$), aunque no mostró una interacción tiempo x tratamiento ($F(6, 120) = 2.097$, $p = 0.058$). El análisis de los efectos principales mostró diferencias significativas en la actividad motora de los animales tratados con etanol en relación a los correspondientes controles para las sesiones experimentales 1º, 3º y 4º ($p = 0.002$, $p = 0.012$, y $p = 0.008$, respectivamente), mientras que esto no ocurrió para las sesiones 2º, 5º, 6º y 7º ($p = 0.135$, $p = 0.110$, $p = 0.259$ y $p = 0.360$, respectivamente).

Además, la activación motora inducida por el etanol se redujo significativamente con el paso de las sesiones: la actividad motora inducida por

la droga en las sesiones experimentales 2^o, 4^o, 5^o, 6^o y 7^o difirió significativamente de la obtenida en la 1^o ($p=0.003$ para la 2^o sesión y $p\leq 0.001$ para el resto), sugiriendo claramente la aparición de tolerancia. La evidencia experimental relativa a este fenómeno quedó ligeramente en entredicho ya que el análisis estadístico también detectó una reducción significativa en la actividad motora de los animales tratados con vehículo en la sesión 7^a en relación a la 1^a ($p=0.004$), sugiriendo que al menos, en parte, un fenómeno de habituación al entorno experimental/ experimentador/ técnica puede explicar la tolerancia detectada usando este protocolo de administración del etanol.

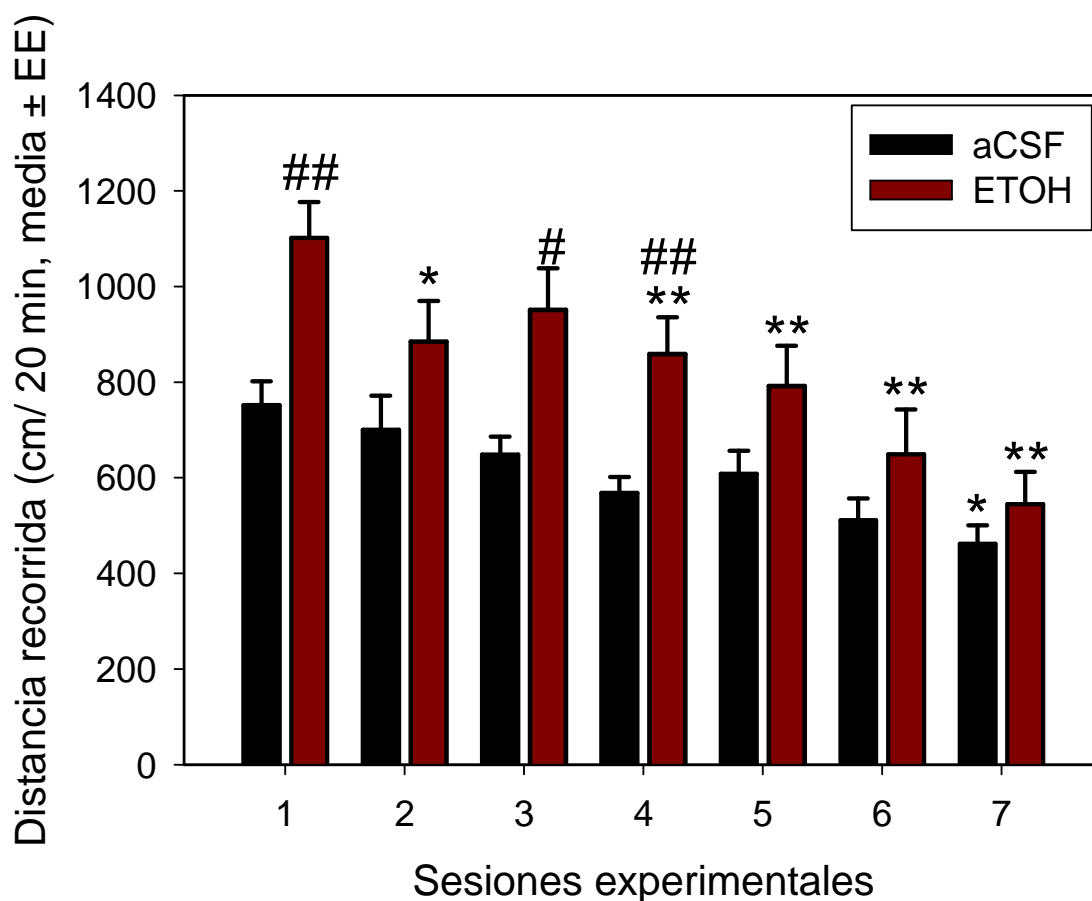


Figura 4.29: Efecto de la administración repetida de 150 nmoles de etanol en VTAp siguiendo el protocolo 2 sobre la actividad locomotora ($n=9-13$ animales/ grupo). Valores expresados como media \pm EE. Las almohadillas indican diferencias significativas entre grupos para cada sesión experimental ($\# p < 0.05$, $## p < 0.01$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las sesiones experimentales señaladas respecto a la primera para un mismo grupo ($* p < 0.01$, $** p \leq 0.001$).

En el presente experimento, al terminar las 7 sesiones de administración de etanol o vehículo, cuyos resultados se recogen en la figura anterior, se procedió a la realización de lo que denominamos “challenge test 1” y “challenge test 2” en los días 8 y 9 del experimento. Los resultados de estos ensayos aparecen representados en las figuras 4.30 y 4.31, respectivamente.

Como se aprecia la administración de una dosis de 35 nmoles de etanol en el challenge test 1, dió lugar a una ligera activación locomotora en los animales pretratados con 150 nmoles de etanol durante las sesiones 1 a 7 del experimento. El análisis estadístico confirmó la significación de estas diferencias ($p=0.042$) entre el grupo control y el experimental.

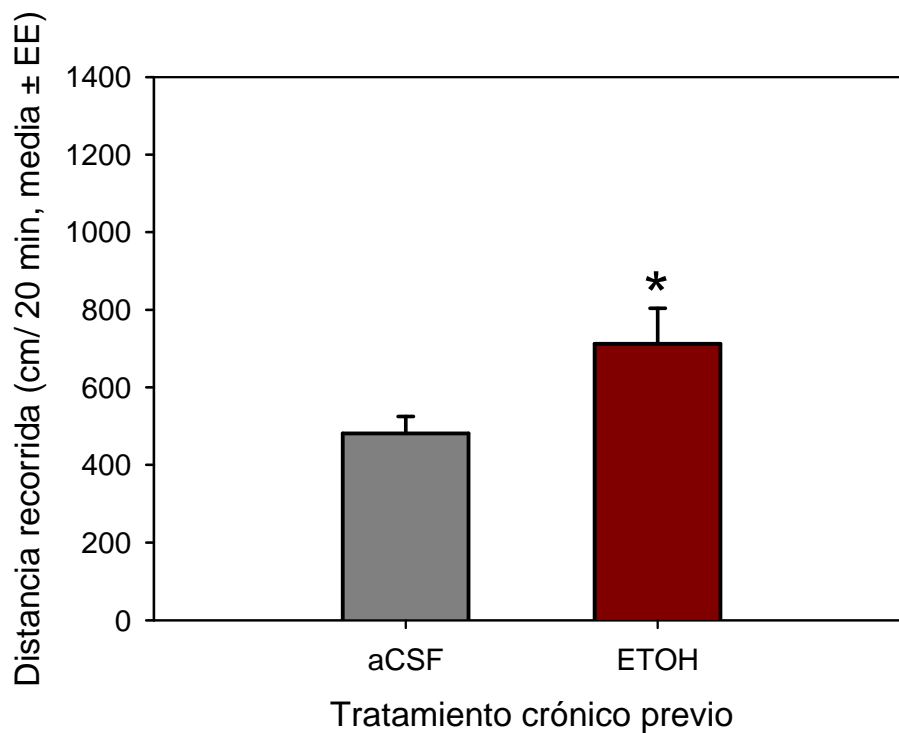


Figura 4.30: Resultados del challenge test 1. En este ensayo los animales recibieron la administración intra-VTAp de **35 nmoles de etanol** en el día 8 del experimento. Valores expresados como media \pm EE. El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo control ($p= 0.042$).

En el challenge test 2 todos los animales recibieron una administración intra-VTAp de 0.0013 nmoles de DAMGO. Como se aprecia en la figura 4.31, los animales pretratados con etanol durante las sesiones 1 a 7 del experimento fueron ligeramente más sensibles a los efectos activadores del DAMGO, que los animales pretratados con vehículo, aunque el análisis estadístico de las distancias medias totales recorridas por los animales de ambos grupos no detectó diferencias significativas ($p= 0.238$).

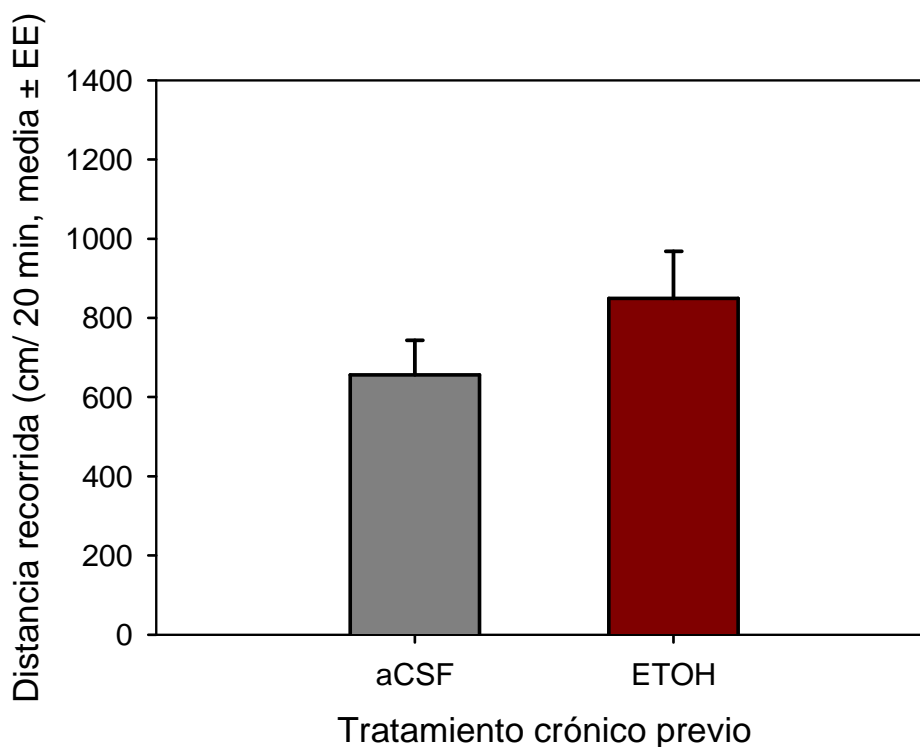


Figura 4.31: Resultados del challenge test 2. En este ensayo los animales recibieron la administración intra-VTAp de **0.0013 nmoles de DAMGO** en el día 9 del experimento. Valores expresados como media \pm EE.

5. DISCUSIÓN

La presente Tesis Doctoral analiza los efectos de la administración localizada en el VTAp de etanol y de su derivado metabólico, acetaldehído, sobre la actividad locomotora de ratas Wistar. Adicionalmente, se ha analizado el mecanismo a través del cual el etanol y su metabolito ejercen efectos excitatorios cuando se administran en VTAp, así como, si el acetaldehído generado a partir del etanol administrado localmente es un elemento necesario para la aparición de los efectos excitatorios del etanol.

Desde un punto de vista comportamental, diversos autores han postulado la implicación del acetaldehído en los efectos excitatorios del etanol a nivel central (Brown y col. 1978; Myers y col. 1982; Smith y col. 1984; Aragón y col. 1986). El acetaldehído procedente de metabolismo hepático del etanol no parece ser el responsable, en opinión de algunos autores, de los efectos excitatorios antes aludidos puesto que, de acuerdo con los datos de la literatura, es incapaz de alcanzar niveles apreciables en el cerebro (Eriksson y Sippel. 1977; Westcott y col. 1980), excepto cuando sus niveles en sangre son excepcionalmente elevados: en esta situación, la aldehído deshidrogenasa presente en la microvasculatura del cerebro se satura siendo incapaz de metabolizarlo completamente (Tabakoff y col. 1976). Así pues, si el acetaldehído participa en la génesis de algunos de los efectos centrales del etanol, su origen debe ser cerebral, es decir, debe producirse *in situ* en el cerebro tras la ingestión de etanol, y para ello, la maquinaria enzimática necesaria para su formación debe estar presente en el cerebro (Zimatkin y col. 2006).

5.1. ESTUDIO DE LOS NIVELES BASALES DE EXPRESIÓN E INDUCIBILIDAD DEL CYP2E1 EN EL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO

Como se comentó en el epígrafe 1.1 de la presente Tesis, la catalasa es el principal sistema biotransformador responsable del metabolismo del etanol en el cerebro (Zimatkin y col. 2006; Hipólito y col. 2007). Su presencia parece ser bastante homogénea a lo largo del cerebro y, por tanto, podría justificar por sí misma la producción cerebral de acetaldehído a partir del etanol. En concreto, en el VTA, la catalasa se expresa en niveles apreciables, aunque algo menores que los encontrados en otras zonas cerebrales (Moreno y col. 1995; Zimatkin y Lindros. 1996). El otro sistema enzimático que participa significativamente en el metabolismo del etanol en el cerebro es el representado por el CYP2E1. Es éste el segundo sistema metabólico en importancia a nivel cerebral para el alcohol; su participación viene a representar, en condiciones normales, aproximadamente el 20% del metabolismo local de esta droga (Zimatkin y col. 2006). Un aspecto que hace particularmente interesante el estudio del papel del CYP2E1 en el metabolismo cerebral del alcohol es su sensibilidad a la inducción. En efecto, el sistema CYP2E1 puede ser inducido por el propio etanol, lo que potencialmente puede incrementar de modo significativo su participación en los procesos de degradación de la droga a nivel cerebral. Por ello, nuestros experimentos iniciales se encaminaron a demostrar la presencia y potencial inducción, por parte del etanol, del CYP2E1 en el sistema MCLD de la rata.

La **presencia de CYP2E1 en cerebro** ha sido previamente demostrada mediante el empleo de diferentes metodologías (Tindberg y Ingelman-Sundberg. 1996; Upadhyay y col. 2000; Kapoor y col. 2006). Estos estudios han mostrado que la expresión de esta enzima parece ser dependiente de la región cerebral y del tipo celular analizado (Hipólito y col. 2007). Parece existir cierta unanimidad entre la comunidad científica en que los niveles de expresión a nivel hepático son más elevados que los encontrados en cerebro, aunque, bien es cierto que existen discrepancias en relación a la magnitud de estas diferencias (Hansson y col. 1990; Anandatheerthavarada y col. 1993; Warner y

Gustafsson. 1994; Roberts y col. 1994; Montoliu y col. 1995; Tindberg y Ingelman-Sundberg. 1996; Upadhyaya y col. 2000; Yadav y col. 2006). Los resultados de nuestro **experimento 1** están en clara concordancia con la opinión general y muestran que los niveles cerebrales son claramente más bajos que los hallados a nivel hepático: en concreto suponen entre el 3 y 13% (dependiendo del área cerebral considerada) de los encontrados a nivel hepático.

Es interesante destacar que la presencia de CYP2E1 en el sistema MCLD no había sido estudiada de modo conjunto y comparado hasta la fecha. Si bien algunos autores habían demostrado la existencia de inmunoreactividad para el CYP2E1 en el citoplasma de células de VTA y SNpc (Riedl y col. 1996) e incluso en NAc (Hansson y col. 1990; Joshi y Tyndale. 2006) los estudios parecían discrepar en cuanto a los **niveles de expresión** y no permitían el estudio comparativo entre las tres regiones clave de este sistema MCLD. Otros estudios previos, también demostraron la presencia de CYP2E1 en estriado y en corteza (Howard y col. 2003; Yadav y col. 2006), pero, como los anteriormente comentados, adolecían de la misma problemática. Los resultados de nuestro experimento 1 constituyen el primer estudio detallado y comparativo de la distribución y expresión basal de la isoforma CYP2E1 en las tres áreas fundamentales del sistema MCLD del cerebro de rata, y nos han permitido, no sólo confirmar la presencia de esta enzima en las tres regiones estudiadas, sino también demostrar que sus niveles de expresión son particularmente elevados en VTA y PFC en relación a los detectados en NAc.

Otro hallazgo importante derivado de estos experimentos ha sido el relacionado con la potencial inducción del CYP2E1 por parte del alcohol. Este fenómeno de **inducción enzimática** había sido previamente estudiado por diferentes autores, empleando diversas metodologías y diferentes protocolos de administración de la droga para la inducción del enzima. Aunque los resultados publicados pueden parecer a primera vista contradictorios (ver tabla 1.1) globalmente muestran la inducibilidad del CYP2E1 tanto a nivel cerebral, como a nivel hepático, por parte del etanol (Forkert y col. 1991). Sin embargo, al igual que ocurría con los datos publicados en relación con la expresión, los datos existentes en relación a su potencial inducción enzimática, específicamente en el sistema MCLD, son prácticamente inexistentes. Concretamente, no se han

encontrado estudios previos que haciendo uso de la técnica de *immunoblotting* analicen la inducción de este sistema en NAc y VTA. Sí existen, por el contrario, trabajos que estudien el fenómeno en PFC, aunque los resultados no parecen concordantes: mientras algunos autores demuestran una clara inducción del enzima en esta región (Upadhya y col. 2000; Howard y col. 2003), otros son incapaces de detectarla (Yadav y col. 2006).

De este modo, creemos que nuestros resultados correspondientes al **experimento 2** aportan información relevante sobre la potencial inducción, por el etanol, de esta enzima en el sistema MCLD. Nuestros hallazgos demuestran que el tratamiento repetido con etanol es capaz de producir un incremento significativo, aunque moderado, en los niveles de expresión de CYP2E1 en VTA, siendo los cambios detectados en NAc y en PFC no relevantes desde el punto de vista estadístico. Nuestro hallazgo concerniente a la inducción del CYP2E1 en VTA constituye información totalmente novedosa y creemos que también relevante, como más adelante comentaremos.

Nuestros resultados muestran que el etanol, al menos bajo el régimen de exposición empleado en la presente Memoria, es incapaz de incrementar los niveles de expresión del CYP2E1 en PFC, lo que está en concordancia con los hallazgos de algunos grupos de investigación (Yadav y col. 2006). Otros autores (Upadhya y col. 2000), sin embargo, sí observaron un incremento en los niveles del enzima en la corteza cerebral, tras el tratamiento crónico con etanol (1%, v/v, durante 30 días). Diferencias metodológicas, tal vez sean las responsables de estas discrepancias. En concreto, las diferencias en el protocolo seguido para el tratamiento con etanol, así como en el protocolo temporal de toma de muestras, podrían explicar los diferentes resultados obtenidos. Particularmente cabe destacar que el anticuerpo primario empleado en el presente trabajo fue monoclonal, mientras que en la mayoría de estudios existentes en la literatura se emplearon anticuerpos policlonales, que evidentemente poseen menor especificidad. Todos estos aspectos podrían contribuir a las discrepancias observadas.

En definitiva y más allá de algunas discrepancias con los resultados previamente publicados por otros grupos de investigación, los resultados de nuestro **estudio sobre el CYP2E1 en el sistema MCLD** ponen claramente de manifiesto la presencia en el cerebro, y en concreto en PFC, NAc y VTA, de la

maquinaria enzimática necesaria para metabolizar el etanol, y por lo tanto, para la génesis localizada en el cerebro de su principal metabolito. Además, la demostración de que el uso continuado del etanol puede inducir el **CYP2E1 en VTA** abre nuevas perspectivas para el estudio de fenómenos muy relevantes desde el punto de vista de la adicción como son la sensibilización comportamental o la tolerancia al etanol.

5.2. ACETALDEHÍDO Y EFECTOS NEUROCOMPORTAMENTALES DEL ETANOL

Tras demostrar que la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar el etanol (o al menos una parte significativa de la misma, el CYP2E1) está presente en el cerebro y, en concreto, en el VTA, iniciamos el conjunto de estudios que perseguían analizar los posibles efectos excitatorios del etanol sobre las neuronas DA del VTA, y la participación del acetaldehído y/o sus derivados en dichos efectos.

5.2.1. Activación locomotora producida por etanol y acetaldehído: papel del VTAp

Los datos bibliográficos permiten afirmar que los efectos de la administración de etanol sobre la actividad locomotora de las ratas dependen fundamentalmente de la **vía de administración** de la droga. Aunque existen algunos estudios que demuestran que el etanol, administrado **sistémicamente**, induce una activación locomotora en ratas selectivamente criadas por su elevada preferencia por el alcohol (Paivarinta y Korpi. 1993; Colombo y col. 1998; Rodd y col. 2004), en general, la administración sistémica de etanol, suele conducir no sólo a una disminución de la actividad locomotora (es decir, a una depresión) en diferentes estirpes de rata (Duncan y Cook. 1981; Frye y

Breese. 1981; Masur y col. 1986; Correa y col. 2003b; Chuck y col. 2006), sino también a una sedación y pérdida del reflejo postural, cuando las dosis administradas de la droga son elevadas (2-3 g/ kg dependiendo de la ruta de administración) (Paez y Myers. 1990; Webb y col. 2002).

Sin embargo, la administración **intracerebral** de la droga produce, en general, una estimulación motora en los animales, que ocurre de modo dosis-dependiente. Por ejemplo, Correa y col (Correa y col. 2003a) demostraron que dosis pequeñas o moderadas de etanol, administradas intracerebro-ventricularmente, eran capaces de incrementar la locomoción en ratas. Recientemente, se han desarrollado diversos estudios para conocer las bases neuroanatómicas de este fenómeno. Lógicamente, estos estudios perseguían, en primer lugar, **localizar las zonas cerebrales potencialmente implicadas en los efectos estimulantes del alcohol** tras su administración intracerebral, y fue de este modo cuando en 2006, se describió que el etanol microinyectado en SNpr era capaz de generar una potente estimulación locomotora en ratas Sprague-Dawley (Arizzi-LaFrance y col. 2006). Este estudio también mostró que el acetaldehído inyectado en esta misma región, era capaz de reproducir el fenómeno de activación motora observado para el etanol. Además, los efectos estimulantes del etanol administrado en SNpr podían ser reducidos por la co-administración sistémica de azida sódica, un inhibidor de la catalasa que, como ya se ha comentado, es el principal sistema que convierte el etanol en acetaldehído en el cerebro. Todos los resultados sugerían que el metabolito del etanol podía ser el agente verdaderamente activo desde el punto de vista excitatorio a nivel central, tal y como venía siendo reivindicado por diferentes autores desde hace casi 30 años (Amit y col. 1980; Aragón y col. 1986).

Otros estudios posteriores han constatado la existencia de otras regiones sensibles a los efectos tanto del etanol como del acetaldehído. Por ejemplo, hoy sabemos que las administraciones de etanol y acetaldehído en NArc hipotalámico también son capaces de generar activación motora en la rata (Pastor y Aragón. 2008; Correa y col. 2009a).

Sin embargo, curiosamente, otra zona cerebral claramente relacionada con la actividad locomotora exploratoria como es el VTA, ha permanecido ajena a los estudios sobre la implicación del acetaldehído en los efectos activadores del etanol hasta fechas muy recientes. De hecho, la única referencia en relación

con su participación en la activación motora de la rata tras la administración intracerebral del alcohol consiste en un estudio piloto, del que no se mostraron resultados, y que fue citado por Correa y col. en 2005 (Quertemont y col. 2005b).

Las neuronas DA ubicadas en VTA proyectan a diferentes zonas del cerebro, especialmente a NAc (como se ha detallado en el capítulo de Antecedentes), y se activan tras la administración de drogas de abuso produciendo una mayor liberación de DA en los lugares de proyección. La activación de las neuronas DA de VTA es un fenómeno clave para lograr la activación motora que posibilita la exploración del entorno en busca de recompensas (Pankseep. 1998; Ikemoto. 2007). De hecho, todas las drogas de abuso generan incrementos en la actividad motora de la rata tras su administración localizada en VTA (Joyce y Iversen. 1979; Vezina. 1993; Devine y Wise. 1994; Perugini y Vezina. 1994; Panagis y col. 1996; Bontempi y Sharp. 1997; Cornish y Kalivas. 2001), lo que ha convertido el análisis de la actividad motora de los animales en un índice comportamental que refleja con bastante exactitud el estado de activación de las neuronas DA del VTA. Sin embargo, el VTA es una región funcionalmente heterogénea, y tal como se ha comentado en el capítulo de Antecedentes, diversos estudios avalan que la zona relevante desde el punto de vista de la detección de las recompensas tal vez sea la zona posterior, VTAp. Esto indica que el VTAp puede ser una región de especial interés y es por ello que hemos centrado nuestra atención en ella.

Distintos estudios electrofisiológicos y neuroquímicos han demostrado que las administraciones **sistémicas** de etanol (Mereu y col. 1984; Gessa y col. 1985; 25) y/o acetaldehído (Foddai y col. 2004) son capaces de incrementar la actividad de las neuronas DA de VTA además de incrementar la liberación de dopamina en NAc (Imperato y Di Chiara. 1986; Howard y col. 2008; Enrico y col. 2009; Hipólito y col. 2009). Y lo que es más importante, la administración localizada de acetaldehído en VTA produce también un aumento en los niveles extracelulares de dopamina en NAc (Melis y col. 2007). Por tanto, la consecuencia lógica de la administración local en VTA de etanol o de

acetaldehído (si es que participa en la activación de las neuronas de VTA) debería ser una conspicua activación motora.

Como muestran los resultados de nuestro **experimento 3** (Figura 4.9), las microinyecciones de etanol o acetaldehído en VTAp producen un incremento de la actividad locomotora de modo dosis-dependiente en ratas Wistar, indicando que el VTAp es una zona cerebral clave y altamente sensible a sus efectos. A su vez, estos resultados demuestran que el acetaldehído, principal metabolito del etanol, es un compuesto activo a nivel central, como algunos autores ya habían postulado anteriormente (Amit y col. 1980; Aragón y col. 1986).

En nuestro estudio, las dosis empleadas, tanto de etanol como de acetaldehído, fueron inferiores a las administradas intracerebralemente en otros trabajos. Por ejemplo, Arizzi-laFrance y col. (Arizzi-LaFrance y col. 2006) empleando dosis superiores a 350 nmoles, observaron estimulación locomotora en ratas Sprague-Dawley, cuando estos compuestos fueron microinyectados en SNr. Pastor y col. (Pastor y Aragón. 2008), por su parte, empleando dosis en torno a 1390 nmoles de etanol, detectaron estimulación locomotora en la misma raza de rata, tras su administración en NArc, y, del mismo modo, Correa y col. (Correa y col. 2009a) administraron, mediante microinyección en NArc, dosis por encima de 350 nmoles de acetaldehído y mostraron activación en los animales. Las dosis eficaces en nuestros experimentos han sido ligeramente inferiores: 150 nmoles para el caso del etanol y 250 nmoles para el acetaldehído. Este hallazgo podría estar sugiriendo que las diferentes zonas cerebrales de estudio presentan diferente sensibilidad a los efectos estimulantes de estos compuestos, siendo, aparentemente, el VTAp una zona más sensible a dichos efectos.

Es importante en este contexto señalar que nuestro grupo de investigación también ha demostrado que el salsolinol (Sal), un derivado isoquinolínico del acetaldehído, produce similares efectos estimulantes motores en los animales, cuando se microinyecta en VTAp (Hipólito y col. 2010). Pero curiosamente, las dosis necesarias para producir la activación motora fueron significativamente inferiores a las necesarias en el caso del etanol o el acetaldehído (del orden de 5000 y 8300 veces más bajas, respectivamente), lo que abre la posibilidad de

que este derivado isoquinolínico del acetaldehído sea un factor más a considerar en la explicación de cómo el etanol/ acetaldehído activan las neuronas DA de VTAp, tal y como comentaremos más adelante.

5.2.2. Implicación de los receptores opioides en los efectos estimulantes del etanol y del acetaldehído

Nuestros experimentos también han mostrado que el bloqueo de los receptores opioides de tipo μ impide que tanto el etanol como el acetaldehído evoquen sus respuestas activadoras tras su administración en VTAp.

Como se comentó previamente, diversos estudios anteriores habían demostrado, la implicación del sistema opioide endógeno en la génesis y modulación de la activación motora inducida por el etanol (Camarini y col. 2000; Sanchís-Segura y col. 2000; Sanchís-Segura y Aragón. 2002; Miquel y col. 2003; Sanchís-Segura y col. 2004). Según estos estudios, los antagonistas opioides no selectivos son capaces de reducir de un modo dosis-dependiente la activación locomotora generada por la administración i.p. de etanol (Kiiianmaa y col. 1983; Camarini y col. 2000; Sanchís-Segura y col. 2004). Sin embargo, parecen ser los receptores de tipo μ , y no los de tipo δ , los implicados en los efectos estimulantes motores tras la administración sistémica de etanol en ratones (Hall y col. 2001; Sanchís-Segura y col. 2004; Pastor y col. 2005). Consecuentemente, decidimos comprobar si la activación motora observada en las ratas tras la administración intra-VTAp de etanol o acetaldehído era dependiente o al menos modulable a través de los receptores opioides en general y, del subtipo μ , en particular.

Como mostramos en las Figuras 4.11 y 4.13, el bloqueo no selectivo y localizado de los receptores opioides en VTAp con naltrexona, fue capaz de suprimir la activación locomotora generada por la administración tanto de etanol como de acetaldehído, indicando que estos receptores son un mediador necesario de los efectos de estos compuestos en la rata. Del mismo modo, se muestra que el bloqueo localizado y selectivo de los receptores opioides de tipo

μ , mediante el uso de β -FNA, suprime los efectos estimulantes locomotores de estos compuestos, señalando así de un modo más concreto a este subtipo de receptores opioides como los mediadores necesarios de los efectos activadores tanto del etanol como del acetaldehído.

Una vez más, nuestros resultados sugieren que el acetaldehído ejerce sus efectos de un modo análogo al empleado por el etanol: produce activación motora aprovechando biofases y dianas aparentemente equivalentes. Sin embargo, para demostrar que los efectos observados sobre la locomoción de los animales tras la administración de etanol en VTAp son consecuencia del acetaldehído generado al metabolizarse la droga localmente en esta región, es necesario recurrir a otro tipo de estrategias como se comentó en Antecedentes. En esta tesis se ha optado por el uso de agentes secuestrantes del acetaldehído como se discute a continuación.

5.2.3. Participación del acetaldehído cerebral en los efectos estimulantes del etanol en VTAp: uso de agentes secuestrantes

En nuestro intento por confirmar que los efectos activantes derivados de la administración intra-VTAp de etanol se deben al acetaldehído y no al etanol *per se* hemos empleado el uso de agentes secuestrantes del acetaldehído como estrategia farmacológica.

Diversos estudios han demostrado que la administración sistémica de DP, un agente secuestrante del acetaldehído, previene la activación locomotora evocada por la administración sistémica de etanol en ratones (Font y col. 2005). Además, la DP es capaz de reducir el consumo voluntario de etanol en ratas Long Evans (Font y col. 2006a), el condicionamiento de preferencia de lugar en ratones (Font y col. 2006b) y ratas (Peano y col. 2008) y la activación de las neuronas DA mesolímbicas producida por el etanol o el acetaldehído administrados intragástricamente en ratas (Enrico y col. 2009).

Como indican los resultados del **experimento 6**, la DP, administrada sistémicamente, redujo e incluso suprimió (el efecto fue dosis-dependiente) la

activación motora inducida por el etanol administrado directamente en el VTAp, sin reducir por sí misma la actividad locomotora de los animales (Figura 4.17). Por tanto, nuestros datos sugieren claramente que el acetaldehído, **generado localmente** en VTAp tras la administración de etanol, es el responsable necesario de la activación locomotora inducida por etanol en ratas. Es importante destacar que el particular diseño de nuestro experimento (administración sistémica de DP combinada con la administración intra-VTA de etanol) ha sido crucial para alcanzar esta conclusión. Habitualmente, los trabajos en los que se estudia el papel de acetaldehído en los efectos comportamentales del etanol emplean la administración sistémica tanto de los inhibidores de la catalasa (o, en otros estudios, agentes secuestrantes del acetaldehído) como del etanol. Como ha sido comentado anteriormente, este modo de proceder ha sido muy útil para demostrar la implicación del acetaldehído en los efectos comportamentales del etanol, pero no es del todo adecuado para determinar cuál es el origen del acetaldehído (cerebral o hepático) implicado en estos efectos. El estudio de Sanchís-Segura y col. (Sanchís-Segura y col. 2005a) fue el primero, y según nuestros datos también el único, que combinó la inhibición de la producción local de acetaldehído con la administración sistémica de etanol señalando, por tanto, inequívocamente al metabolismo cerebral como el responsable de la producción del acetaldehído relevante desde el punto de vista comportamental. El presente estudio, combina, por primera vez, la administración sistémica de un agente secuestrante del acetaldehído (la DP) con la administración intracerebral de etanol, lo que nos ha permitido también certificar el origen cerebral del acetaldehído.

El VTA, tal y como demostramos en esta Tesis, expresa CYP2E1. Además, como ya indicamos, diversos estudios también han mostrado que esta área del cerebro expresa también la enzima catalasa, el principal sistema metabolizador del etanol en el cerebro (Quertemont y col. 2005b; Zimatkin y col. 2006; Hipólito y col. 2007). Por lo tanto, es factible, desde un punto de vista bioquímico, que el etanol microinyectado intra-VTA sea transformado localmente en acetaldehído. La consecuencia lógica de esta suposición es que el secuestro del acetaldehído debería ser capaz de reducir o prevenir completamente la

activación locomotora derivada de la administración intra-VTA_p de etanol. Además, desde un punto de vista teórico, el efecto debería ser dosis dependiente: niveles elevados de DP en plasma deberían conducir a bajos niveles de acetaldehído libre en VTA_p y, en consecuencia, a una menor activación motora. Ésto es, de hecho, lo que se observa en la Figura 4.17: la administración del agente secuestrante DP reduce, de forma dosis-dependiente, los efectos del etanol inyectado localmente de modo que conforme la dosis de DP administrada aumenta, la activación motora inducida por etanol se reduce hasta llegar, finalmente, a desaparecer.

Los efectos de la DP mostraron una clara especificidad. Como indican los resultados del **experimento 6B** mostrados en la Figura 4.19, la dosis más elevada de DP fue incapaz de alterar la locomoción inducida por DAMGO, sugiriendo claramente la especificidad de acción de la DP. Resultados similares fueron publicados por Font y col. (Font y col. 2005). En efecto, estos autores mostraron que la DP era capaz de modificar el efecto del etanol sobre la locomoción sin afectar a la locomoción inducida por la cocaína o la cafeína.

Como se comentó en el capítulo de Resultados, los datos del experimento 6A mostraron una tendencia muy interesante cuando las ratas fueron tratadas con la dosis de DP más elevada (50 mg/ kg). En estos animales, la distancia recorrida tras la microinyección de etanol tendió a ser inferior a la obtenida en el respectivo grupo control. Es decir, los datos de este experimento parecían indicar que una supresión significativa del acetaldehído formado al metabolizarse el etanol en VTA_p, no sólo eliminaba los efectos activadores del etanol sino que dejaba al descubierto un efecto depresor sobre la actividad motora. Aunque los análisis estadísticos no confirmaron la significación de esta tendencia, decidimos explorarla con mayor detalle variando ligeramente las condiciones del experimento. La hipótesis que nos planteamos asumía que si conseguíamos, mediante la selección adecuada de las dosis tanto de etanol como de DP, maximizar el secuestro del acetaldehído formado tras la administración del etanol, optimizando la relación molar entre el agente secuestrante y el acetaldehído, tal vez podríamos visualizar con mayor claridad el efecto depresor que parecía apuntarse en el experimento 6A. Recordemos que en ese experimento se empleó la dosis de etanol que condujo a un efecto

activante máximo desde el punto de vista motor, es decir, 150 nmoles: en estas condiciones es posible que no todo el acetaldehído formado quedase secuestrado por la DP, incluso aunque se administrase la dosis de 50 mg/kg del agente secuestrante. Para asegurar el completo secuestro del acetaldehído podíamos proceder, por tanto, de dos maneras: (1) o aumentar la dosis de DP administrada por encima de 50 mg/kg manteniendo la dosis de etanol en 150 nmoles o (2) reducir la dosis de etanol administrada manteniendo la dosis de DP en 50 mg/kg. Optamos por esta segunda alternativa.

Se decidió así utilizar en el **experimento 7** una dosis muy baja de etanol (35 nmoles), incapaz de alterar la actividad locomotora basal de los animales, en combinación con la dosis de DP de 50 mg/kg, es decir con la más alta de las ensayadas en el anterior experimento. Como se muestra en la Figura 4.23, cuando se utilizó esta nueva combinación, el etanol redujo significativamente la actividad motora de los animales, comportándose, tal y como suponíamos, como depresor.

Estos resultados indican que cuando se maximiza el secuestro del acetaldehído derivado del metabolismo del etanol, el etanol remanente no biotransformado actúa produciendo efectos depresores. A día de hoy no disponemos de datos que nos permitan afirmar a través de qué diana molecular ejerce tal efecto, pero dada su claramente demostrada capacidad para interaccionar con el receptor GABA_A y la capacidad para modular a la baja la actividad de las neuronas DA que presenta este receptor en el VTAp, esta podría ser una más que factible hipótesis de trabajo (Yim y Mogenson. 1980; Johnson y North. 1992b; Westerink y col. 1996). De hecho, esta idea es compatible con los hallazgos de diferentes autores que han observado que la activación local de los receptores GABA_A inhibe la frecuencia de disparo de las neuronas DA en VTA (Kalivas y col. 1990; Churchill y col. 1992; Westerink y col. 1996; Xi y Stein. 1998; Laviolette y van der Kooy. 2001; Amantea y Bowery. 2004; Doherty y Gratton. 2007).

En resumen, este conjunto de evidencias indican: (i) que el acetaldehído formado localmente es el responsable de los efectos excitadores del etanol sobre las neuronas DA de VTAp y (ii) que el etanol no biotransformado podría

ejercer efectos depresores sobre estas neuronas. En condiciones normales, es decir, en condiciones en las que no se impide la acción del acetaldehído, el efecto neto derivado de la administración de etanol dependerá del balance entre las acciones excitatorias ejercidas por el acetaldehído y las depresoras mediadas por el propio etanol, lo cual podría ayudar a explicar los perfiles en U invertida hallados para las curvas dosis respuesta correspondientes al etanol en relación con la actividad motora.

5.2.4. Fenómenos de tolerancia y sensibilización comportamental al etanol

Como sucede tras la administración aguda de etanol en la que pueden observarse fenómenos excitatorios y depresores, la administración repetida de esta droga también parece dar lugar a la aparición de estos dos comportamientos contrapuestos. Las microinyecciones repetidas de etanol en el VTAp producen un fenómeno de tolerancia a los efectos estimulantes locomotores en ratas Wistar, tal y como mostraron los **experimentos 8A y 8C**, en los que empleando diferentes protocolos de administración intra-VTA del etanol, se pudo evidenciar una tolerancia comportamental (Figuras 4.25 y 4.29). Sin embargo, como se observa en la Figura 4.30, la utilización de una dosis baja de etanol (**experimento 8C**), que en condiciones normales no producía de modo agudo activación motora, permitió demostrar la existencia de efectos estimulantes locomotores de la droga sólo en aquellos animales que tuvieron una experiencia previa con la droga.

La ausencia de sensibilización motora tras la administración repetida de etanol observada en el experimento 8A no puede atribuirse, en nuestra opinión, al empleo de un protocolo de administración inadecuado ya que este mismo protocolo sí fue capaz de desarrollar sensibilización locomotora cuando la sustancia administrada fue el DAMGO (**experimento 8B**, Figura 4.27). Hemos de concluir por tanto, que aunque los efectos estimulantes del etanol sean debidos a la acción del acetaldehído (o sus derivados) sobre los receptores

opioides de tipo μ , los cambios plásticos inducidos por el etanol tras su administración repetida en VTAp son mucho más complejos que los inducidos por los agonistas selectivos del receptor opioide de tipo μ .

Correa y col. (Correa y col. 2003b), empleando un protocolo de administración en el que los animales recibieron 15 microinyecciones de la droga por vía intracerebroventricular, en días alternos, a lo largo de un periodo de 30 días, fueron capaces de detectar sensibilización a los efectos motores del etanol. Pero sus resultados también mostraban la existencia de tolerancia a los efectos estimulantes del etanol, fenómeno que fue aparente, especialmente durante las primeras 5-7 administraciones de la droga. La actividad locomotora de los animales, sin embargo, regresó a los niveles observados en la primera sesión experimental, ilustrando así una desaparición del fenómeno de tolerancia. Desgraciadamente, en nuestras condiciones experimentales no ha sido posible desarrollar adecuadamente un protocolo de administración intra-VTA de larga duración y en días alternos, por problemas, de viabilidad de las cánulas implantadas en los animales (datos no mostrados).

En nuestra opinión, el desarrollo de tolerancia o sensibilización locomotora al etanol administrado es un fenómeno particularmente complejo, ya que esta droga es capaz de generar tanto efectos estimulantes psicomotores, como efectos motores depresores. Esta característica del etanol podría condicionar no sólo el desarrollo sino también la manifestación del fenómeno que dependerá principalmente de las dosis administradas y de los intervalos de dosificación tal y como apuntan nuestros datos y los de algunos otros autores (Read y col. 1966; Pohorecky. 1977; Little. 2000), aunque, otras variables como las condiciones del sujeto y las características del entorno también podrían contribuir al fenómeno (Stewart y Badiani. 1993).

Parece claro, en cualquier caso, que la administración intracerebral repetida de etanol ocasiona cambios plásticos que parecen afectar al sistema MCLD, pero, ¿cuáles pueden ser estos cambios neuroadaptativos en el circuito de recompensa?

Aunque somos conscientes de que los datos presentados en esta tesis no son concluyentes a este respecto, los experimentos de sensibilización cruzada

entre el etanol y agonistas específicos de diferentes sistemas receptores, que hemos iniciado en la presente Tesis, pueden constituir una herramienta clave para contestar a tan difícil cuestión. Así, los resultados del “challenge test 2” en el experimento 8C sugieren el desarrollo de una tendencia, en los animales con experiencia previa al etanol, al aumento en la sensibilidad a los efectos estimulantes de una pequeña dosis de DAMGO, lo que indicaría una adaptación en las vías de señalización opioide mediadas por los receptores de tipo μ . Estos cambios podrían estar implicados en el desarrollo de sensibilización a los efectos estimulantes del etanol en VTAp. Es bien conocida la capacidad de los agonistas de los receptores μ para desarrollar sensibilización motora (Vasko y Domino. 1978; Joyce y Iversen. 1979; Vezina y Stewart. 1984; Vezina y col. 1987) a través de un aumento en la señalización mediada por los receptores μ localizados en las interneuronas GABA del VTA (Johnson y North. 1992b; Fields y col. 2007). Así pues, un aumento en las consecuencias farmacodinámicas derivadas de la interacción del acetaldehído o sus derivados con los receptores opioides de tipo μ , podría explicar la sensibilización a los efectos excitatorios del etanol tras su administración repetida en VTAp. Sin embargo, este fenómeno no sirve para explicar el fenómeno de tolerancia comportamental observado tras la administración repetida de la droga. Aunque en la presente Memoria no se ha abordado el estudio de este problema, creemos, como apuntamos más arriba, que un buen punto de partida podría ser analizar los cambios producidos en la señalización a través de los receptores GABA_A. La fracción no biotransformada del etanol administrado de modo agudo en VTAp es, probablemente, capaz de activar o facilitar la actividad de estos receptores, de modo que su sobreestimulación continuada en un régimen de administración múltiple con etanol podría, en principio, producir neuroadaptaciones que explicasen el desarrollo de tolerancia.

Por otra parte, en la génesis de estos fenómenos de tolerancia y sensibilización no debemos descartar cambios en la farmacocinética, y más concretamente en el metabolismo del etanol: recordemos que nuestros experimentos han demostrado la posibilidad de inducción del sistema CYP2E1, con lo que, hipotéticamente, se abre la puerta a la posibilidad de que un aumento en la

proporción de etanol metabolizado localmente en VTAp pueda ser el responsable de la sensibilización motora detectada tras la administración repetida de la droga.

En definitiva, nuestros resultados ponen de manifiesto que la administración repetida de etanol en VTAp es capaz de desarrollar tolerancia a los efectos estimulantes de la droga, pero también sensibilización a dosis pequeñas de la droga. Probablemente, los receptores opioides de tipo μ estén implicados en el desarrollo del fenómeno de sensibilización. Del mismo modo, y aunque se necesitan más experimentos para poder realizar cualquier afirmación, cambios en la señalización mediada por los receptores GABA_A en VTAp podrían estar implicados en el desarrollo de la tolerancia a los efectos del etanol. Los datos presentados en esta Memoria abren, sin duda, una gran cantidad de posibles investigaciones futuras que permitirán comprender mejor los mecanismos que explican los complejos efectos del etanol sobre las neuronas DA del VTA.

5.2.5. Una hipótesis de trabajo sobre cómo el etanol excita las neuronas DA de VTA.

Las drogas de abuso comparten una característica importante: son capaces de activar las neuronas DA del VTA, provocando así un incremento en la liberación de dopamina en NAc y otras regiones límbicas (Nestler. 2001; Hyman y col. 2006). El etanol no es una excepción a esta regla. La administración directa del etanol en el VTA produce un incremento en la actividad de las neuronas DA de VTA tanto *in vitro* (Brodie y col. 1990; Brodie y co. 1999b; Xiao y col. 2007; Xiao y Ye. 2008; Xiao y col. 2009) como *in vivo* (Mereu y col. 1984; Gessa y col. 1985; Foddai y col. 2004), y un subsiguiente incremento de los niveles de dopamina en NAc (Ding y col. 2009). Del mismo modo, el etanol es capaz de incrementar la dopamina en NAc tras su administración i.p. (Imperato y col. 1986), intragástrica (Enrico y col. 2009) o intravenosa (Howard y col. 2008; Hipólito y col. 2009). Además, cuando el etanol es administrado directamente en VTAp es capaz de producir una

activación motora, como se muestra en el presente trabajo, que es el reflejo comportamental del incremento de los niveles de dopamina en NAc.

Curiosamente, el acetaldehído también genera un incremento de la actividad de las neuronas DA de VTA (Foddai y col. 2004), así como un incremento de los niveles de dopamina en NAc cuando es administrado intra-VTAp (Melis y col. 2007; Hipólito y col. 2008) o intra-gástricamente (Enrico y col. 2009). Como demuestran nuestros datos, el acetaldehído administrado en VTAp también es capaz de generar una activación comportamental, al igual que el etanol.

Igualmente, nuestro grupo ha demostrado también que el Sal (derivado de la condensación del acetaldehído y la dopamina) inyectado en VTAp es capaz de incrementar los niveles de dopamina en NAc (Hipólito y col. 2011), así como generar una estimulación comportamental (Hipólito y col. 2010), a dosis varios órdenes de magnitud por debajo de los necesarios para el caso del etanol o el acetaldehído.

Pero ¿cómo generan el etanol o el acetaldehído estos efectos excitatorios?

Las neuronas DA de VTA están controladas, por muy diversos sistemas, aunque, fundamentalmente, las aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas constituyen los elementos de control más importantes de su actividad. Por este motivo, distintos investigadores han focalizado su estudio en los efectos del etanol sobre la función de los receptores NMDA y GABA_A (Morikawa y Morrisett. 2010). Sin embargo, los efectos descritos para el etanol sobre la actividad de estos importantes canales iónicos, predicen, más bien, un efecto inhibitorio sobre las neuronas DA de VTA, que no, uno excitatorio. Así pues, parece que otros mecanismos deben estar implicados en los efectos activadores del etanol sobre la actividad de esta población neuronal.

Algunos autores sostienen que el etanol puede **excitar directamente**, *per se*, las neuronas DA del VTA. Los estudios publicados por el grupo liderado por Mark Brodie constituyen el más claro exponente de esta escuela de pensamiento. Según estos autores, sus estudios sobre los efectos del etanol en los canales iónicos dependientes de voltaje indican que el etanol puede incrementar directamente la frecuencia espontánea de disparo de las neuronas DA de VTA, por la reducción de la conductancia de los canales de K⁺ (Brodie y

Appel. 1998; Brodie y col. 1999a; Brodie y coll. 1999b; Brodie y Appel. 2000; Appel y col. 2003; Koyama y Appel. 2006). Se ha de destacar, sin embargo, que la relevancia de estos resultados ha sido matizada por diversos autores debido a que en los registros se emplearon concentraciones de etanol alrededor de 80 mM. Además, y lo que es más importante, estos efectos excitatorios podrían no ser debidos al etanol, sino al acetaldehído, ya que como se demostró recientemente, el uso de un inhibidor de la catalasa es capaz de prevenir completamente las acciones estimulantes del etanol sobre las neuronas DA de VTA (Melis y col. 2007).

La opción alternativa a la propuesta por Brodie y su grupo, considera la excitación de las neuronas DA de VTA como una consecuencia **indirecta** de la acción del etanol, que se produciría a través de su **interacción con el sistema opioide**. Esta opción es apoyada por muchos otros grupos de investigación, entre ellos el nuestro. Recientes evidencias electrofisiológicas indican la exposición a etanol es capaz de alterar la transmisión GABA a las neuronas DA de VTA a través de un mecanismo mediado por receptores opioides de tipo μ (Xiao y col. 2007; Xiao y Ye. 2008; Guan y Ye. 2010). Pero el modo a través de cual el etanol interacciona con estos receptores, es a día de hoy, desconocido. Se han postulado, sin embargo, diferentes hipótesis. Así, algunos autores han propuesto la hipótesis de que el etanol ejerce sus efectos estimulantes a través de la liberación del **péptido opioide endógeno β -endorfina** (Sanchís-Segura y col. 2000; Sanchís-Segura y Aragón. 2002; Pastor y col. 2005), está basada en el hecho de que el etanol y otras drogas de abuso son capaces de inducir la liberación de este péptido a nivel del NArc del hipotálamo (Zangen y col. 1999), del NAc (Zangen y col. 1999; Olive y col. 2001; Roth-Deri y col. 2003; Marinelli y col. 2004) y del mesencéfalo, incluyendo el VTA (Rasmussen y col. 1998; Jarjour y col. 2009), permitiendo que el péptido liberado active los receptores opioides μ presentes en estas regiones (Sanchís-Segura y col. 2005a). De hecho, se ha demostrado que las células que sintetizan péptidos derivados de la POMC están presentes en NArc del hipotálamo, núcleo del tracto solitario y los lóbulos anterior y neurointermedio de la glándula pituitaria (Watson y col. 1977; Gee y col. 1983; Khachaturian y col. 1985; Bronstein y col. 1992), que pueden enviar proyecciones endorfinérgicas a diferentes regiones del cerebro,

entre ellas NAc y VTA (Watson y col. 1977; Zakarian y Smyth. 1982; Khachaturian y col. 1985). Además, las lesiones del NAc hipotalámico, suprimen la activación inducida por etanol administrado sistémicamente (Sanchís-Segura y col. 2000). Recientemente, se ha demostrado que el etanol inyectado en el NAc del hipotálamo promueve la activación motora en ratas, siendo sensible dicho efecto tanto a la inhibición de la catalasa como a la administración de naltrexona (Pastor y Aragón. 2008). Por tanto, existen datos que apoyan la hipótesis de que el NAc y sus neuronas β -endorfinicas se requieren para la estimulación inducida por etanol. Sin embargo, no hay datos claros que expliquen cómo el etanol, o más específicamente el acetaldehído, interactúan con las neuronas del NAc. Para ello, a partir de los resultados hallados en algunos estudios *in vitro* (Reddy y Sarkar. 1993; Pastorcic y col. 1994; Reddy y col. 1995), se ha postulado que las isoformas delta y/o ϵ de la proteína quinasa C pueden ser las dianas para que el etanol promueva la liberación de β -endorfina (De y col. 2002). En cualquier caso, esta hipótesis que podría explicar los resultados derivados de la administración sistémica o localizada en NAc de etanol, difícilmente serviría para explicar los resultados mostrados en la presente tesis o los obtenidos en otros trabajos como los de Arizzi y col (Arizzi-LaFrance y col. 2006) en los que los efectos sobre el comportamiento motor se han observado tras la administración **localizada** de etanol en VTA o en SNpr. Por otra parte, el hecho de que la administración de otras drogas de abuso, como la cocaína o la anfetamina provoque, también, una liberación de β -endorfina en NAc (Olive y col. 2001) parece sugerir que no se trata de un efecto específico del etanol.

Otra explicación alternativa postula que el acetaldehído, generado localmente tras metabolizarse el etanol, reacciona con aminas biógenas, como la dopamina, para generar diversos compuestos, algunos de los cuales presentan capacidad para interactuar con los receptores opioides. Estos compuestos son las llamadas tetrahydroisoquinolinas (THIQs). Según esta hipótesis, conocida como la teoría THIQs (Cohen y Collins. 1970; Davis y Walsh. 1970; Duncan y Dietrich. 1980; Melchior y Myers. 1977), el bloqueo de la formación de estos compuestos o, alternativamente, el bloqueo de sus correspondientes dianas, suprimiría alguna de las consecuencias comportamentales producidas por la

administración de etanol. Una de las THIQs más estudiadas ha sido el salsolinol (Sal), producto resultante de la condensación del acetaldehído y la dopamina. Existen múltiples hipótesis sobre las posibles dianas para la acción del Sal (ver Hipólito y col. 2008). La más probable parece ser la que propone que el Sal se comportaría como un agonista de los receptores opioides de tipo μ (Critcher y col. 1983; Myers y col. 1985; Matsuzawa y col. 2000; Hipólito y col. 2008). Según esta idea el bloqueo farmacológico de estos receptores debería ser capaz de prevenir los efectos producidos por el Sal (y, por tanto, los producidos por el etanol y el acetaldehído), y, en efecto, ésto es lo que se observa: los antagonistas selectivos de los receptores de tipo μ previenen tanto la estimulación motora generada por la administración intra-VTAp de Sal, acetaldehído y etanol (esta Tesis e Hipólito y col. 2010), como los incrementos concomitantes de los niveles de dopamina en NAc (Hipólito y col. 2011).

Sin embargo, esta hipótesis presenta, a día de hoy, importantes lagunas: la más relevante, está relacionada con la falta de evidencias experimentales sólidas que demuestren un aumento en los niveles de Sal en VTAp tras la administración aguda de etanol o acetaldehído. Aunque con la mejora de las técnicas analíticas, diversos autores han demostrado la presencia e incluso el aumento de los niveles de Sal tras la administración continuada de etanol (Starkey y col. 2006; Rojkovicova y col. 2008), se ha de reconocer que no se han publicado todavía datos concluyentes en relación a su producción tras la administración aguda de la droga. Parece claro que deben diseñarse y ejecutarse nuevos experimentos que demuestren o descarten la aparición de Sal tras la administración aguda de etanol, lo que permitirá confirmar o refutar definitivamente esta hipótesis.

6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The main goal of this Doctoral Thesis has been to gain an insight in the role displayed by the acetaldehyde derived from the brain metabolism of ethanol in the ethanol-evoked motor stimulant responses in rats. The studies have been performed, mainly, in the posterior ventral tegmental area, a brain area of the mesocorticolimbic system that plays a key role in the initiation and development of addictive disorders. We plan our initial experiments to determine whether CYP2E1, an enzyme that participates in the metabolism of ethanol, is present in the different areas involved in the dopaminergic mesocorticolimbic projection, and specially, in the ventral tegmental area. Following, a series of experiments were planned and developed to analyze one of the most conspicuous behavioural consequences of dopamine mesolimbic neurons stimulation: locomotor activation. Through the motor behavior analysis of the animals, we investigate: (i) whether ethanol and/ or its main metabolite, acetaldehyde, directly administered into the posterior ventral tegmental area, are able to activate this projection and (ii) the possible role of opioid receptors in this activation. Moreover, the pharmacological inactivation of acetaldehyde by means of sequestering agents has been used in order to demarcate “who’s who” in the excitatory acute effects of ethanol in the posterior ventral tegmental area. Finally, the present Doctoral Thesis has been completed with the study of the adaptative changes in motor behavior evoked by the repeated administration of the drug directly into the posterior ventral tegmental area. The results obtained in this Thesis have shed some tracks about the ethanol effects on ventral tegmental area dopamine neurons, but also, they have set up new questions about the acute actions of ethanol in this brain region.

The most relevant conclusions derived from the data obtained in the present thesis are:

1. CYP2E1 is present in the mesocorticolimbic system at different levels of expression, being the highest in prefrontal cortex and ventral tegmental area. Moreover, chronic ethanol treatment is able to significantly increase the expression of the enzyme in the ventral tegmental area.

2. The posterior ventral tegmental area is one of the brain sites at which ethanol and its first metabolite, acetaldehyde, may act to induce locomotor activity in rats.
3. The local blockade of the opioid receptors, particularly the μ opioid receptors, is able to suppress the locomotor activation induced by ethanol and acetaldehyde in posterior ventral tegmental area, suggesting the participation of these receptors in the stimulating effects of both substances.
4. Acetaldehyde, derived from the local metabolism of ethanol, is responsible for the locomotor activation produced by intra-posterior ventral tegmental area ethanol. Ethanol, *per se*, seems to have motor depressant effects when acetaldehyde is pharmacologically inactivated.
5. Repeated intra-posterior ventral tegmental area administration of 150 nmol of ethanol (a dose producing the maximum activating effects in our acute experiments), produces a complex adaptative change in the motor responses of the rats: animals displayed tolerance to the motor activating effects when they received 150 nmol of ethanol whereas the administration of 35 nmol of the drug evoked a sensitized response.
6. Further research is necessary to disentangle the complex mechanisms involved in the effects of ethanol on ventral tegmental area dopamine neurons.

BIBLIOGRAFÍA

Amantea D, Bowery NG (2004) Reduced inhibitory action of a GABAB receptor agonist on [3H]-dopamine release from rat ventral tegmental area in vitro after chronic nicotine administration. *BMC Pharmacol* 4:24.

Amit Z, Aragón CM (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 (Berl)* 95:512-515.

Amit Z, Brown ZW, Rockman GE, Smith B, Amir S (1980) Acetaldehyde: a positive reinforcer mediating ethanol consumption. *Adv Exp Med Biol* 126:413-423.

Anandatheerthavarada HK, Shankar SK, Bhamre S, Boyd MR, Song BJ, Ravindranath V (1993) Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res* 601:279-285.

Appel SB, Liu Z, McElvain MA, Brodie MS (2003) Ethanol excitation of dopaminergic ventral tegmental area neurons is blocked by quinidine. *J Pharmacol Exp Ther* 306:437-446.

Aragón CM, 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.

Aragón CM, Rogan F, Amit Z (1992) Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. *Biochem Pharmacol* 44:93-98.

Aragón CM, Amit Z (1992) 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 CM, Spivak K, Amit Z (1991a) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 39:55-59.

Aragón CM, Stotland LM, Amit Z (1991b) Studies on ethanol-brain catalase interaction: evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol Clin Exp Res* 15:165-169.

Aragón CM, 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 CM, 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 CM, 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 CM, Sternklar G, Amit Z (1985b) A correlation between voluntary ethanol consumption and brain catalase activity in the rat. *Alcohol* 2:353-356.

Arbuthnott GW, Wickens JR (1996) Dopamine cells are neurones too! *Trends Neurosci* 19:279-280.

Arizzi-LaFrance MN, Correa M, Aragón CM, Salamone JD (2006) Motor stimulant effects of ethanol injected into the substantia nigra pars reticulata: importance of catalase-mediated metabolism and the role of acetaldehyde. *Neuropsychopharmacology* 31:997-1008.

Asai H, Imaoka S, Kuroki T, Monna T, Funae Y (1996) Microsomal ethanol oxidizing system activity by human hepatic cytochrome P450s. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1004-1009.

Smith BR, Amit Z, Splawinsky J (1984) Conditioned Place Preference Induced by Intraventricular Infusions of Acetaldehyde. *Alcohol* 1:193-195.

Badaway A, Evans M (1981) The mechanism of the antagonism by naloxone of acute alcohol intoxication. *Br J Pharmacol* 174:514- 516.

Balcita-Pedicino JJ, Sesack SR (2005) Projections from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area in the rat: synapses onto mesoaccumbens and mesoprefrontal cell populations. *Soc Neurosci Abstr* 605.8.

Bartoletti M, Gaiardi M, Gubellini C, Bacchi A, Babbini M (1987) Previous treatment with morphine and sensitization to the excitatory actions of opiates: dose-effect relationship. *Neuropharmacology* 26:115-119.

Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175:191-217.

Beisswenger TB, Holmquist B, Vallee BL (1985) χ -ADH is the sole alcohol dehydrogenase isozyme of mammalian brains: implications and inferences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8369-8373.

Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191:391-431.

Bhagwat SV, Boyd MR, Ravindranath V (1995) Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Arch Biochem Biophys* 320:73-83.

Boleda MD, Julia P, Moreno A, Pares X (1989) Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys* 274:74-81.

Bontempi B, Sharp FR (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci* 17:8596-8612.

Brannan TS, Maker HS, Raes IP (1981) Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *J Neurochem* 36:307-309.

Brodie MS, Appel SB (2000) Dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of C57BL/6J and DBA/2J mice differ in sensitivity to ethanol excitation. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1120-1124.

Brodie MS, McElvain MA, Bunney EB, Appel SB (1999a) Pharmacological reduction of small conductance calcium-activated potassium current (SK) potentiates the excitatory effect of ethanol on ventral tegmental area dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 290:325-333.

Brodie MS, Pesold C, Appel SB (1999b) Ethanol directly excites dopaminergic ventral tegmental area reward neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1848-1852.

Brodie MS, Appel SB (1998) The effects of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area studied with intracellular recording in brain slices. *Alcohol Clin Exp Res* 22:236-244.

Brodie MS, Shefner SA, Dunwiddie TV (1990) Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res* 508:65-69.

Bronstein DM, Schafer MK, Watson SJ, Akil H (1992) Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res* 587:269-275.

Brown Z.W., Amit Z., Smith B. (1980) Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats. *Behav Neural Biol* 28 (2):150-155.

Brown ZW, Amit Z, Smith B, Rockman GE. (1978) Differential effects on conditioned taste aversion learning with peripherally and centrally administered acetaldehyde. *Neuropharmacology* 17(11):931-935.

Cagniard B, Beeler JA, Britt JP, McGehee DS, Marinelli M, Zhuang X (2006) Dopamine scales performance in the absence of new learning. *Neuron* 51:541-547.

Calenco-Choukroun G, Dauge V, Gacel G, Roques BP (1991) Lesion of dopamine mesolimbic neurons blocks behavioral effects induced by the endogenous enkephalins but not by a mu-opioid receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 209:267-271.

Camarini R, Nogueira Pires ML, Calil HM (2000) Involvement of the opioid system in the development and expression of sensitization to the locomotor-activating effect of ethanol. *Int J Neuropsychopharmacol* 3:303-309.

Carr DB, Sesack SR (2000) GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38:114-123.

Chefer VI, Shippenberg TS (2009) Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 34:887-898.

Chuck TL, McLaughlin PJ, Arizzi-LaFrance MN, Salamone JD, Correa M (2006) Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci* 79:154-161.

Chuhma N, Zhang H, Masson J, Zhuang X, Sulzer D, Hen R, Rayport S (2004a) Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* 24:972-981.

Churchill L, Dilts RP, Kalivas PW (1992) Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acidA receptors within the ventral tegmental area. *Neurochem Res* 17:101-106.

Cohen G, Collins M (1970) Alkaloids from catecholamines in adrenal tissue: Possible role in alcoholism. *Science* 167: 1749-1751.

Cohen G, Sinet PM, Heikkila R (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, Gessa GL (1998) Stimulation of locomotor activity by voluntarily consumed ethanol in Sardinian alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol* 357:109-113.

Conrad LC, Pfaff DW (1976) Autoradiographic tracing of nucleus accumbens efferents in the rat. *Brain Res* 113:589-596.

Cornish JL, Kalivas PW (2001) Repeated cocaine administration into the rat ventral tegmental area produces behavioral sensitization to a systemic cocaine challenge. *Behav Brain Res* 126:205-209.

Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271-284.

Correa M, Arizzi-Lafrance MN, Salamone JD (2009a) Infusions of acetaldehyde into the arcuate nucleus of the hypothalamus induce motor activity in rats. *Life Sci* 84:321-327.

Correa M, Viaggi C, Escrig MA, Pascual M, Guerri C, Vaglini F, Aragón CM, Corsini GU (2009b) Ethanol intake and ethanol-induced locomotion and locomotor sensitization in Cyp2e1 knockout mice. *Pharmacogenet Genomics* 19:217-225.

Correa M, Manrique HM, Font L, Escrig MA, Aragón CM (2008) Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed acetaldehyde: the role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents. *Psychopharmacology (Berl)* 200:455-464.

Correa M, Pascual M, Sanchís-Segura C, Guerri C, Aragón CM (2005) Lead-induced catalase activity differentially modulates behaviors induced by short-chain alcohols. *Pharmacol Biochem Behav* 82:443-452.

Correa M, Roig-Navarro AF, Aragón CM (2004a) Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci* 74:2009-2021.

Correa M, Sanchís-Segura C, Pastor R, Aragón CM (2004b) Ethanol intake and motor sensitization: the role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiol Behav* 82:231-240.

Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003a) 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 MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003b) Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology (Berl)* 170:368-375.

Correa M, Sanchís-Segura C, Aragón CM (2001) Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug Alcohol Depend* 65:9-15.

Correa M, Miquel M, Aragón CM (2000) Lead acetate potentiates brain catalase activity and enhances ethanol-induced locomotion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 66:137-142.

Correa M, Miquel M, Sanchís-Segura C, Aragón CM (1999a) Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol* 19:43-49.

Correa M, Miquel M, Sanchís-Segura C, Aragón CM (1999b) Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: the role of brain catalase. *Alcohol Clin Exp Res* 23:799-805.

Crabbe JC, Dorsa DM (1986) Neonatal monosodium glutamate lesions alter neurosensitivity to ethanol in adult mice. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1343-1351.

Critchler EC, Lin CI, Patel J, Myers RD (1983) Attenuation of alcohol drinking in tetrahydroisoquinoline-treated rats by morphine and naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 18:225-229.

Davis VE, Walsh MJ (1970) Alcohol, amines, and alkaloids: A possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science* 167: 1005-1007.

De A, Boyadjieva N, Sarkar DK (2002) Role of protein kinase C in control of ethanol-modulated beta-endorphin release from hypothalamic neurons in primary cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 301:119-128.

Devine DP, Wise RA (1994) Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14:1978-1984.

Devine DP, Leone P, Wise RA (1993) Mesolimbic dopamine neurotransmission is increased by administration of mu-opioid receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 243:55-64.

Diana M, Peana AT, Sirca D, Lintas A, Melis M, Enrico P (2008) Crucial role of acetaldehyde in alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Ann N Y Acad Sci* 1139:307-317.

Ding ZM, Rodd ZA, Engleman EA, McBride WJ (2009) Sensitization of ventral tegmental area dopamine neurons to the stimulating effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1571-1581.

Doherty M, Gratton A (2007) Differential involvement of ventral tegmental GABA(A) and GABA(B) receptors in the regulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress. *Brain Res* 1150:62-68.

Duncan PM, Cook NJ (1981) Ethanol-amphetamine interaction effects on spontaneous motor activity and fixed-interval responding. *Psychopharmacology (Berl)* 74:256-259.

Duncan C, Deitrich RA (1980) A critical evaluation of tetrahydroisoquinoline induced ethanol preference in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 13: 265-281.

Enrico P, Sirca D, Mereu M, Peana AT, Lintas A, Golosio A, Diana M (2009) Acetaldehyde sequestering prevents ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine transmission. *Drug Alcohol Depend* 100:265-271.

Eriksson CJ, Sippel HW (1977) The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-I. The distribution of acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochem Pharmacol* 26:241-247.

Escarabajal D, Miquel M, Aragón CM (2001) L-cysteine, a thiol amino acid, increases the stimulating acute effect of ethanol on locomotion. *Alcohol* 25:83-88.

Escarabajal D, Miquel M, Aragón CM (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 MD, Aragón CM (2002a) Concurrent administration of diethyldithiocarbamate and 4-methylpyrazole enhances ethanol-induced locomotor activity: the role of brain ALDH. *Psychopharmacology (Berl)* 160:339-343.

Escarabajal MD, Aragón CM (2002b) The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:389-395.

Fallon JH, Schmued LC, Wang C, Miller R, Banales G (1984) Neurons in the ventral tegmentum have separate populations projecting to telencephalon and inferior olive, are histochemically different, and may receive direct visual input. *Brain Res* 321:332-336.

Farin FM, Omiecinski CJ (1993) Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J Toxicol Environ Health* 40:317-335.

Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 30:289-316.

Finley JC, Lindstrom P, Petrusz P (1981) Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33:28-42.

Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M (2004) Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology* 29:530-536.

Font L, Miquel M, Aragón CM (2008) Involvement of brain catalase activity in the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference. *Physiol Behav* 93:733-741.

Font L, Aragón CM, Miquel M (2006a) Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behav Brain Res* 171:78-86.

Font L, Aragón CM, Miquel M (2006b) Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D -penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde. *Psychopharmacology (Berl)* 184:56-64.

Font L, Miquel M, Aragón CMG (2005) Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: A sequestration agent for acetaldehyde. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 29:1156-1164.

Forkert PG, Massey TE, Jones AB, Park SS, Gelboin HV, Anderson LM (1991) Distribution of cytochrome CYP2E1 in murine liver after ethanol and acetone administration. *Carcinogenesis* 12:2259-2268.

Frye GD, Breese GR (1981) An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)* 75:372-379.

Galter D, Carmine A, Buervenich S, Duester G, Olson L (2003) Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur J Biochem* 270:1316-1326.

Garzon M, Pickel VM (2001) Plasmalemmal mu-opioid receptor distribution mainly in nondopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. *Synapse* 41:311-328.

Gasbarri A, Verney C, Innocenzi R, Campana E, Pacitti C (1994) Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res* 668:71-79.

Gaunt GL, de Duve C (1976) Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *J Neurochem* 26:749-759.

Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ (1983) Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376.

Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490:270-294.

Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22:5173-5187.

Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348:201-203.

Gill K, Liu Y, Deitrich RA (1996) Voluntary alcohol consumption in BXD recombinant inbred mice: relationship to alcohol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 20:185-190.

Gill K, Menez JF, Lucas D, Deitrich RA (1992) Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol Clin Exp Res* 16:910-915.

Gingras MA, Cools AR (1996) Analysis of the biphasic locomotor response to ethanol in high and low responders to novelty: a study in Nijmegen Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 125:258-264.

Goto Y, Grace AA (2005) Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nat Neurosci* 8:805-812.

Grace AA, Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866-2876.

Grace AA, Bunney BS (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4:2877-2890.

Guan YZ, Ye JH (2010) Ethanol blocks long-term potentiation of GABAergic synapses in the ventral tegmental area involving mu-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology* 35:1841-1849.

Hall FS, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154:43-49.

Hamby-Mason R, Chen JJ, Schenker S, Perez A, Henderson GI (1997) Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1063-1072.

Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg MaK, C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience* 34(2):451-463.

Hipólito L., Martí-Prats L., Sánchez-Catalán MJ., Polache A., Granero L. (2011) Rewarding and dopaminergic stimulant effects of salsolinol in posterior VTA of rats: Involvement of μ -opioid receptors. *Neurosci.Lett.* in press.

Hipólito L, Sánchez-Catalán MJ, Zanolini I, Polache A, Granero L (2008) Intrategmental administration of acetaldehyde induces dopamine release in nac core: role of mu opioid receptors . Normand Award Meeting, ESBRA.

Hipólito L, Sanchez-Catalan MJ, Zornoza T, Polache A, Granero L (2010) Locomotor stimulant effects of acute and repeated intrategmental injections of salsolinol in rats: role of mu-opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 209:1-11.

Hipólito L, Sanchez-Catalan MJ, Polache A, Granero L (2009) Induction of brain CYP2E1 changes the effects of ethanol on dopamine release in nucleus accumbens shell. *Drug Alcohol Depend* 100:83-90.

Hipólito L, Sanchez-Catalan MJ, Zanolini I, Polache A, Granero L (2008) Shell/core differences in mu- and delta-opioid receptor modulation of dopamine efflux in nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 55:183-189.

Hipólito L, Sanchez MJ, Polache A, Granero L (2007) Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. *Curr Drug Metab* 8:716-727.

Howard EC, Schier CJ, Wetzell JS, Duvauchelle CL, Gonzales RA (2008) The shell of the nucleus accumbens has a higher dopamine response compared with the core after non-contingent intravenous ethanol administration. *Neuroscience* 154:1042-1053.

Howard LA, Miksys S, Hoffmann E, Mash D, Tyndale RF (2003) Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br J Pharmacol* 138:1376-1386.

Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG, Miller R (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114:475-492.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598.

Ikemoto S, Goeders NE (1998) Microinjections of dopamine agonists and cocaine elevate plasma corticosterone: dissociation effects among the ventral and dorsal striatum and medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 814:171 - 178.

Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27-78.

Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006) Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26:723-730.

Ikemoto S, Wise RA (2002) Rewarding effects of the cholinergic agents carbachol and neostigmine in the posterior ventral tegmental area. *J Neurosci* 22:9895-9904.

Imperato A, Di Chiara G (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 239:219-228.

Jacobsen E (1952) The metabolism of ethyl alcohol. *Pharmacol Rev* 4:107-135.

Jarjour S, Bai L, Gianoulakis C (2009) Effect of acute ethanol administration on the release of opioid peptides from the midbrain including the ventral tegmental area. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1033-1043.

Johansson I, Ingelman-Sundberg M (1988) Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat and rabbit liver microsomes. *Cancer Res* 48:5387-5390.

Johnson SW, North RA (1992a) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450:455-468.

Johnson SW, North RA (1992b) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483-488.

Joshi M, Tyndale RF (2006) Regional and cellular distribution of CYP2E1 in monkey brain and its induction by chronic nicotine. *Neuropharmacology* 50:568-575.

Joyce EM, Iversen SD (1979) The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat. *Neurosci Lett* 14:207-212.

Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H (1990) Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 253:858-866.

Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, Dwivedi UN, Gupta YK, Seth PK, Parmar D (2006) Differences in sensitivity of cultured rat brain neuronal and glial cytochrome P450 2E1 to ethanol. *Life Sci* 79:1514-1522.

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.

Khachaturian H, Lewis ME, Schafer MK, Watson SJ (1985) Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends in neurosciences* 8:11-119.

Kiianmaa K, Hoffman PL, Tabakoff B (1983) Antagonism of the behavioral effects of ethanol by naltrexone in BALB/c, C57BL/6, and DBA/2 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 79(4):291-294.

Koechling UM, Amit Z (1994) Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on brain catalase in the mediation of ethanol consumption in mice. *Alcohol* 11:235-239.

Koob GFaLM, M. (2006) *Neurobiology of adicction*. Academic Press, New York.

Koop DR, Coon MJ (1984) Purification of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes 3a and 6 from imidazole-treated rabbits. Evidence for the identity of isozyme 3a with the form obtained by ethanol treatment. *Mol Pharmacol* 25:494-501.

Koop DR, Morgan ET, Tarr GE, Coon MJ (1982) Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem* 257:8472-8480.

Koyama S, Appel SB (2006) A-type K + current of dopamine and GABA neurons in the ventral tegmental area. *Journal of neurophysiology* 96:544-554.

Kunitoh S, Tanaka T, Imaoka S, Funae Y, Monna Y (1993) Contribution of cytochrome P450s to MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system): a specific

and sensitive assay of MEOS activity by HPLC with fluorescence labeling. *Alcohol Alcohol Suppl* 1B:63-68.

Lands WE (1998) A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 15:147-160.

Lane BP, Lieber CS (1966) Ultrastructural alterations in human hepatocytes following ingestion of ethanol with adequate diets. *Am J Pathol* 49:593-603.

Lasker JM, Raucy J, Kubota S, Boswick BP, Black M, Lieber CS (1987) Purification and characterization of human liver cytochrome P-450-ALC. *Biochem Biophys Res Commun* 148:232-238.

Latimer LG, Duffy P, Kalivas PW (1987) Mu opioid receptor involvement in enkephalin activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* 241:328-337.

Lavin A, Nogueira L, Lapish CC, Wightman RM, Phillips PE, Seamans JK (2005) Mesocortical dopamine neurons operate in distinct temporal domains using multimodal signaling. *J Neurosci* 25:5013-5023.

Laviolette SR, van der Kooy D (2001) GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *Eur J Neurosci* 13:1009-1015.

Le AD, Israel Y (1994) A simple technique for quantifying intoxication-induced by low doses of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 48:229-234.

Little HJ (2000) Alcohol as a stimulant drug. *Addiction* 95:1751-1753.

Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2004) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci* 27:460-467.

Manrique HM, Miquel M, Aragón CM (2006a) 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* 51:1137-1145.

Manrique HM, Miquel M, Aragón CM (2006b) 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* 51:1137-1145.

Manrique HM, Miquel M, Aragón CM (2005) Brain catalase mediates potentiation of social recognition memory produced by ethanol in mice. *Drug Alcohol Depend* 79:343-350.

Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* 8:283-305.

Margolis EB, Lock H, Chefer VI, Shippenberg TS, Hjelmstad GO, Fields HL (2006a) Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2938-2942.

Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL (2006b) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* 577:907-924.

Marinelli PW, Quirion R, Gianoulakis C (2004) An in vivo profile of beta-endorphin release in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol. *Neuroscience* 127:777-784.

Markovac J, Goldstein GW (1988) Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessels. *Toxicol Appl Pharmacol* 96:14-23.

Martinez SE, Vaglenova J, Sabria J, Martinez MC, Farres J, Pares X (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268:5045-5056.

Masur J, Oliveira de Souza ML, Zwicker AP (1986) The excitatory effect of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1225-1228.

Matsuzawa S, Suzuki T, Misawa M (2000) Involvement of mu-opioid receptor in the salsolinol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Alcohol Clin Exp Res* 24:366-372.

McDonald RV, Siegel S (2004) Intra-administration associations and withdrawal symptoms: morphine-elicited morphine withdrawal. *Exp Clin Psychopharmacol* 12:3-11.

McFayden MC, Melvin WT, Murray GI (1998) Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochem Pharmacol* 55:825-830.

Melchior CL, Myers RD (1977) Preference for alcohol evoked by tetrahydropapaveroline (THP) chronically infused in the cerebral ventricle of the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 7: 19-35.

Melis M, Enrico P, Peana AT, Diana M (2007) Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci* 26:2824-2833.

Mereu G, Fadda F, Gessa GL (1984) Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* 292:63-69.

Miquel M, Font L, Sanchís-Segura C, Aragón CM (2003) Neonatal administration of monosodium glutamate prevents the development of ethanol-but not psychostimulant-induced sensitization: a putative role of the arcuate nucleus. *Eur J Neurosci* 17:2163-2170.

Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004) Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431:760-767.

Montoliu C, Sancho-Tello M, Azorin I, Burgal M, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem* 65:2561-2570.

Moore T, Junet H, Lewis L (1993) Ethanol-Induced Stimulation and Depression on Measures of Locomotor Activity: Effects of Basal Activity Levels in Rats. *Alcohol* 10:537- 540.

Moreno S, Mugnaini E, Ceru MP (1995) Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 43:1253-1267.

Morikawa H, Morrisett RA (2010) Ethanol action on dopaminergic neurons in the ventral tegmental area: interaction with intrinsic ion channels and neurotransmitter inputs. *Int Rev Neurobiol* 91:235-288.

Myers WD, Mackenzie L, Ng KT, Singer G, Smythe GA, Duncan MW (1985) Salsolinol and dopamine in rat medial basal hypothalamus after chronic ethanol exposure. *Life Sci* 36:309-314.

Myers WD, Ng KT, Singer G (1982) Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rat as a function of schedule, food deprivation and photoperiod. *Pharmacol Biochem Behav* 17:807-811.

Nagasawa HT, Goon DJ, Muldoon WP, Zera RT (1984) 2-Substituted thiazolidine-4(R)-carboxylic acids as prodrugs of L-cysteine. Protection of mice against acetaminophen hepatotoxicity. *J Med Chem* 27:591-596.

Nagasawa HT, Elberling JA, DeMaster EG (1980) Structural requirements for the sequestration of metabolically generated acetaldehyde. *J Med Chem* 23:140-143.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12:1-51.

Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201-217.

Nicola SM (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)* 191:521-550.

Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK (1995) Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs

significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5859-5869.

Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci* 21:RC184.

Olson VG, Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61:87-95.

Omelchenko N, Sesack SR (2006) Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. *J Comp Neurol* 494:863-875.

Omelchenko N, Sesack SR (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483:217-235.

Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25:312-334.

Paez X, Myers RD (1990) Differential actions of RO 15-1788 and diazepam on poikilothermia, motor impairment and sleep produced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 36:915-922.

Paivarinta P, Korpi ER (1993) Voluntary ethanol drinking increases locomotor activity in alcohol-preferring AA rats. *Pharmacol Biochem Behav* 44:127-132.

Pan WX, Schmidt R, Wickens JR, Hyland BI (2005) Dopamine cells respond to predicted events during classical conditioning: evidence for eligibility traces in the reward-learning network. *J Neurosci* 25:6235-6242.

Panagis G, Nisell M, Nomikos GG, Chergui K, Svensson TH (1996) Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Res* 730:133-142.

Pankseep J (1998) *Affective Neuroscience*. Oxford University Press.

Pastor R, Aragón CM (2008) Ethanol injected into the hypothalamic arcuate nucleus induces behavioral stimulation in rats: an effect prevented by catalase inhibition and naltrexone. *Behav Pharmacol* 19:698-705.

Pastor R, Aragón CM (2006) The role of opioid receptor subtypes in the development of behavioral sensitization to ethanol. *Neuropsychopharmacology* 31:1489-1499.

Pastor R, Sanchís-Segura C, Aragón CM (2005) Effect of selective antagonism of mu(1)-, mu(1/2)-, mu(3)-, and delta-opioid receptors on the locomotor-stimulating actions of ethanol. *Drug Alcohol Depend* 78:289-295.

Pastor R, Sanchís-Segura C, Aragón CM (2002) Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H₂O₂ rate of production. *Psychopharmacology (Berl)* 165:51-59.

Pastorcic M, Boyadjieva N, Sarkar DK (1994) Comparison of the effects of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and beta-endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures. *Mol Cell Neurosci* 5:580-586.

Pautassi RM, Nizhnikov ME, Fabio MC, Spear NE (2011) An acetaldehyde-sequestering agent inhibits appetitive reinforcement and behavioral stimulation induced by ethanol in preweanling rats. *Pharmacol Biochem Behav* 97:462-469.

Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

Peana AT, Muggironi G, Calvisi G, Enrico P, Mereu M, Nieddu M, Boatto G, Diana M (2010) L-Cysteine reduces oral ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-drinking behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94:431-437.

Peana AT, Assaretti AR, Muggironi G, Enrico P, Diana M (2009) Reduction of ethanol-derived acetaldehyde induced motivational properties by L-cysteine. *Alcohol Clin Exp Res* 33:43-48.

Peana AT, Enrico P, Assaretti AR, 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.

Person RE, Chen H, Fantel AG, Juchau MR (2000) Enzymic catalysis of the accumulation of acetaldehyde from ethanol in human prenatal cephalic tissues: evaluation of the relative contributions of CYP2E1, alcohol dehydrogenase, and catalase/oxidases. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1433-1442.

Perugini M, Vezina P (1994) Amphetamine administered to the ventral tegmental area sensitizes rats to the locomotor effects of nucleus accumbens amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 270:690-696.

Phillipson OT (1979) 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.

Pohorecky LA (1977) Brain catecholamines and ethanol: involvement in physical dependence and withdrawal. *Adv Exp Med Biol* 85A:495-513.

Quertemont E, Eriksson CJ, Zimatkin SM, Pronko PS, Diana M, Pisano M, Rodd ZA, Bell RR, Ward RJ (2005a) Is ethanol a pro-drug? Acetaldehyde contribution to brain ethanol effects. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1514-1521.

Quertemont E, Grant KA, Correa M, Arizzi MN, Salamone JD, Tambour S, Aragón CM, McBride WJ, Rodd ZA, Goldstein A, Zaffaroni A, Li TK, Pisano M, Diana M (2005b) The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 29:221-234.

Quertemont E (2003) Discriminative stimulus effects of ethanol with a conditioned taste aversion procedure: lack of acetaldehyde substitution. *Behav Pharmacol* 14:343-350.

Quertemont E, Escarabajal MD, De Witte P (2003) Role of catalase in ethanol-induced conditioned taste aversion: a study with 3-amino-1,2,4-triazole. *Drug Alcohol Depend* 70:77-83.

Quertemont E, De Witte P (2001) Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav* 68:449-454.

Quintanilla ME, Callejas O, Tampier L (2002) Aversion to acetaldehyde: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol* 26:69-74.

Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK (2001) Research advances in ethanol metabolism. *Pathol Biol (Paris)* 49:676-682.

Raskin NH, Sokoloff L (1970) Alcohol dehydrogenase activity in rat brain and liver. *J Neurochem* 17:1677-1687.

Rasmussen DD, Bryant CA, Boldt BM, Colasurdo EA, Levin N, Wilkinson CW (1998) Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol Clin Exp Res* 22:789-801.

Read G, Cutting W, Durst A (1966) Comparison of excited phases after sedatives and tranquilizers. *Psychopharmacology* 1:346-348.

Reddy BV, Sarkar DK (1993) Effect of alcohol, acetaldehyde, and salsolinol on beta-endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 17:1261-1267.

Reddy. B.V., Boyadjieva N, Sarkar DK (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. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 19:339-344.

Redila VA, Smith BR, Amit Z (2000) The effects of aminotriazole and acetaldehyde on an ethanol drug discrimination with a conditioned taste aversion procedure. *Alcohol* 21:279-285.

Riedl AG, Watts PM, Edwards RJ, Boobis AR, Jenner P, Marsden CD (1996) Selective localisation of P450 enzymes and NADPH-P450 oxidoreductase in rat basal ganglia using anti-peptide antisera. *Brain Res* 743:324-328.

Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ (1994) Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1064-1071.

Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 Suppl 2:S91-117.

Rodd ZA, Oster SM, Ding ZM, Toalston JE, Deehan G, Bell RL, Li TK, McBride WJ (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.

Rodd ZA, Bell RL, Kuc KA, Zhang Y, Murphy JM, McBride WJ (2005) Intracranial self-administration of cocaine within the posterior ventral tegmental area of Wistar rats: evidence for involvement of serotonin-3 receptors and dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 313:134-145.

Rodd ZA, Bell RL, McKinzie DL, Webster AA, Murphy JM, Lumeng L, Li TK, McBride WJ (2004) Low-dose stimulatory effects of ethanol during adolescence in rat lines selectively bred for high alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 28:535-543.

Rodd-Henricks ZA, Melendez RI, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK (2002) The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 72:55-64.

Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ (2000) Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:217-224.

Rojkovicova T, Mechref Y, Starkey JA, Wu G, Bell RL, McBride WJ, Novotny MV (2008) Quantitative chiral analysis of salsolinol in different brain regions of rats genetically predisposed to alcoholism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 863:206-214.

Rosin DL, Weston MC, Sevigny CP, Stornetta RL, Guyenet PG (2003) Hypothalamic orexin (hypocretin) neurons express vesicular glutamate transporters VGLUT1 or VGLUT2. *J Comp Neurol* 465:593-603.

Roth-Deri I, Zangen A, Aleli M, Goelman RG, Pelled G, Nakash R, Gispán-Herman I, Green T, Shaham Y, Yadid G (2003) Effect of experimenter-delivered and self-administered cocaine on extracellular beta-endorphin levels in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 84:930-938.

Rotzinger S, Smith BR, Amit Z (1994) Catalase inhibition attenuates the acquisition of ethanol and saccharin-quinine consumption in laboratory rats. *Behav Pharmacol* 5:203-209.

Rubin E, Hutterer F, Lieber CS (1968) Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. *Science* 159:1469-1470.

Rubin E, Lieber CS (1967) Early fine structural changes in the human liver induced by alcohol. *Gastroenterology* 52:1-13.

Ryan DE, Iida S, Wood AW, Thomas PE, Lieber CS, Levin W (1984) Characterization of three highly purified cytochromes P-450 from hepatic microsomes of adult male rats. *J Biol Chem* 259:1239-1250.

Salamone JD (2007) Functions of mesolimbic dopamine: changing concepts and shifting paradigms. *Psychopharmacology (Berl)* 191:389. DOI: 10.1007/s00213-006-0623-9.

Salmela KS, Kessova IG, Tsyrllov IB, Lieber CS (1998) Respective roles of human cytochrome P-450E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res* 22:2125-2132.

Sanchís-Segura C, Correa M, Miquel M, Aragón CM (2005a) Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats. *Neurosci Lett* 376:66-70..

Sanchís-Segura C, Grisel JE, Olive MF, Ghazizadeh S, Koob GF, Roberts AJ, Cowen MS (2005b) Role of the endogenous opioid system on the neuropsychopharmacological effects of ethanol: new insights about an old question. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1522-1527.

Sanchís-Segura C, Pastor R, Aragón CM (2004) Opposite effects of acute versus chronic naltrexone administration on ethanol-induced locomotion. *Behav Brain Res* 153:61-67.

Sanchís-Segura C, Aragón CM (2002) Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion. *Drug Alcohol Depend* 68:189-194.

Sanchís-Segura C, Correa M, Aragón CM (2000) Lesion on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion. *Behav Brain Res* 114:57-63.

Sanchís-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragón CM (1999a) The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. *Alcohol* 19:37-42.

Sanchís-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragón CM (1999b) Daily injections of cyanamide enhance both ethanol-induced locomotion and brain catalase activity. *Behav Pharmacol* 10:459-465.

Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80:1-27.

Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculo-pontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323:387-410.

Serrano E, Pozo OJ, Beltrán J, Hernández F, Font L, Miquel M, Aragón C. (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.

Sesack SR, Pickel VM (1992) Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 320:145-160.

Sirca D, Enrico P, Mereu M, Peana AT, Diana M (2011) L-cysteine Prevents Ethanol-Induced Stimulation of Mesolimbic Dopamine Transmission. *Alcohol Clin Exp Res*. 35:862-9.

Smith BR, Amit Z, Splawinsky J (1984) Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* 1:193-195.

Sohda T, Shimizu M, Kamimura S, Okumura M (1993) Immunohistochemical demonstration of ethanol-inducible P450 2E1 in rat brain. *Alcohol Alcohol Suppl* 1B:69-75.

Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2046-2050.

Starkey JA, Mechref Y, Muzikar J, McBride WJ, Novotny MV (2006) Determination of salsolinol and related catecholamines through on-line preconcentration and liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*:3342-3347.

Steffensen SC, Stobbs SH, Colago EE, Lee RS, Koob GF, Gallegos RA, Henriksen SJ (2006) Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp Neurol* 202:139-151.

Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4:289-312.

Streetman DS, Bertino JS, Jr, Nafziger AN (2000) Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 10:187-216.

Swanson LW (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, Anderson RA, Ritzmann RF (1976) Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 25:1305-1309.

Tampier L, Quintanilla ME, Mardones J (1994) Acetaldehyde metabolism: differences between UChA and UChB rats. *Alcohol Alcohol* 29:751-755.

Tampier L, Quintanilla ME (1991) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the hypothermic effect of ethanol and on ethanol tolerance development. *Alcohol* 8:279-282.

Tampier L, Quintanilla ME, Letelier C, Mardones J (1988) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on narcosis time and lethality of ethanol in UChA rats. *Alcohol* 5:5-8.

Tampier L, Mardones J (1987) Absence of effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on blood ethanol levels after oral administration, in rats. *Alcohol* 4:73-74.

Tampier L, Mardones J (1986) Effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on ethanol blood levels after intraperitoneal administration. *Alcohol* 3:181-183.

Tindberg N, Ingelman-Sundberg M (1996) Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *J Neurochem* 67:2066-2073.

Tirumalai PS, Bhamre S, Upadhy SC, Boyd MR, Ravindranath V (1998) Expression of multiple forms of cytochrome P450 and associated monooxygenase activities in rat brain regions. *Biochem Pharmacol* 56:371-375.

Upadhy SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V (2000) Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys* 373:23-34.

Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215-221.

Vasiliou V, Ziegler TL, Bludeau P, Petersen DR, Gonzalez FJ, Deitrich RA (2006) CYP2E1 and catalase influence ethanol sensitivity in the central nervous system. *Pharmacogenet Genomics* 16:51-58.

Vasko MR, Domino EF (1978) Tolerance development to the biphasic effects of morphine on locomotor activity and brain acetylcholine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 207:848-858.

Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PE, Sulzer D, Wightman RM (2003) Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem* 87:1284-1295.

Vezina P (1993) Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res* 605:332-337.

Vezina P, Kalivas PW, Stewart J (1987) Sensitization occurs to the locomotor effects of morphine and the specific mu opioid receptor agonist, DAGO, administered repeatedly to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens. *Brain Res* 417:51-58.

Vezina P, Stewart J (1984) Conditioning and place-specific sensitization of increases in activity induced by morphine in the VTA. *Pharmacol Biochem Behav* 20:925-934.

Waller MB, Murphy JM, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1986) Effect of low dose ethanol on spontaneous motor activity in alcohol-preferring and -nonpreferring lines of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24:617-623.

Ward SJ, Martin TJ, Roberts DC (2003) Beta-funaltrexamine affects cocaine self-administration in rats responding on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav* 75:301-307.

Warner M, Gustafsson JA (1994) Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1019-1023.

Watson SJ, Barchas JD, Li CH (1977) beta-Lipotropin: localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5155-5158.

Webb B, Burnett PW, Walker DW (2002) Sex differences in ethanol-induced hypnosis and hypothermia in young Long-Evans rats. *Alcohol Clin Exp Res* 26:695-704.

Westcott JY, Weiner H, Shultz J, Myers RD (1980) In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochem Pharmacol* 29:411-417.

Westerink BH, Kwint HF, deVries JB (1996) The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 16:2605-2611.

Wickens JR, Reynolds JN, Hyland BI (2003) Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Curr Opin Neurobiol* 13:685-690.

Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:61-79. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.07.006.

Wrighton SA, Campanile C, Thomas PE, Maines SL, Watkins PB, Parker G, Mendez-Picon G, Haniu M, Shively JE, Levin W (1986) Identification of a human liver cytochrome P-450 homologous to the major isosafrole-inducible cytochrome P-450 in the rat. *Mol Pharmacol* 29:405-410.

Xi ZX, Stein EA (1998) Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABA_A receptors-an in vivo electrochemical study. *Brain Res* 798:156-165.

Xiao C, Shao XM, Olive MF, Griffin WC, 3rd, Li KY, Krnjevic K, Zhou C, Ye JH (2009) Ethanol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 34:307-318.

Xiao C, Ye JH (2008) Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: role of mu-opioid receptors. *Neuroscience* 153:240-248.

Xiao C, Zhang J, Krnjevic K, Ye JH (2007) Effects of ethanol on midbrain neurons: role of opioid receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 31:1106-1113.

Xiao WK, Ye P, Liu DJ, Wu HM, Luo LM (2009) Possible determinants of the radial augmentation index in 4985 Chinese population]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 30:1055-1059.

Yadav S, Dhawan A, Singh RL, Seth PK, Parmar D (2006) Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Mol Cell Biochem* 286:171-180.

Yim CY, Mogenson GJ (1980) Electrophysiological studies of neurons in the ventral tegmental area of Tsai. *Brain Res* 181:301-313.

Zakarian S, Smyth DG (1982) Distribution of beta-endorphin-related peptides in rat pituitary and brain. *Biochem J* 202:561-571.

Zangen A, Solinas M, Ikemoto S, Goldberg SR, Wise RA (2006) Two brain sites for cannabinoid reward. *J Neurosci* 26:4901-4907.

Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE, Wise RA (2002) Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. *J Neurosci* 22:7225-7233.

Zangen A, Nakash R, Yadid G (1999) Serotonin-mediated increases in the extracellular levels of beta-endorphin in the arcuate nucleus and nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neurochem* 73:2569-2574.

Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1500-1505.

Zimatkin SM, Lindros KO (1996) Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol* 31:167-174.