



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

DUAL MOTOR RESPONSES ELICITED BY ETHANOL
ADMINISTERED INTO THE pVTA OF RATS:
IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF A NEW
STRATEGY FOR ALCOHOL-RELAPSE TREATMENT

TESIS DOCTORAL

Lucía Martí Prats

Valencia 2015

Directores:

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**DUAL MOTOR RESPONSES ELICITED BY ETHANOL
ADMINISTERED INTO THE pVTA OF RATS:
IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF A NEW
STRATEGY FOR ALCOHOL-RELAPSE TREATMENT**

TESIS DOCTORAL

Lucía Martí Prats

Valencia 2015

Directores:

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**EFFECTO DUAL DEL ETANOL ADMINISTRADO EN VTAp SOBRE
LA ACTIVIDAD MOTORA DE LA RATA: IMPLICACIONES EN EL
DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA
PARA EL TRATAMIENTO DE LAS RECAÍDAS EN EL
ALCOHOLISMO**

TESIS DOCTORAL

Lucía Martí Prats

Valencia 2015

Directores:

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá



VNIVERSITAT D 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. Lucía Martí Prats que lleva por título: *“Dual motor responses elicited by ethanol administered into the pVTA of rats: Implications for the development of a new strategy for alcohol-relapse treatment”* ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Valencia, a 29 de Septiembre de 2015

Fdo.

Dra. Ana Polache Vengut

Dr. Luis Granero Maciá

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, la autora ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral de investigación del Subprograma “Atracció de Talent” de VLC-CAMPUS según la resolución del 23 de junio de 2011 del Vicerectorat d’Investigació de la Universitat de València.

Esta Tesis Doctoral se ha enmarcado dentro de los proyectos:

“Terapia combinada con agentes secuestrantes de acetaldehído y antagonistas de los receptores opioides como una nueva intervención terapéutica en el tratamiento farmacológico de las recaídas en la dependencia alcohólica: estudios preclínicos”. Financiado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD2009-021), Ministerio de Sanidad y Política Social, y por la la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana (Ayuda complementaria) (GVACOMP2011-239)

“Actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y etanol: papel del salsolinol y de la fracción no metabolizada del etanol”. Financiado por la Universitat de València (Accions especials) (UV-INV-AE13-136776).

A Ana y Luis

A Jorge

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

"La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño...'"

Isaac Asimov

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas.”

Santiago Ramón y Cajal

INDEX

ABREVIATURAS /ABBREVIATIONS	<i>i</i>
GLOSSARY (Glosario)	<i>l</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
<i>Explorando las bases biológicas de los efectos reforzantes del etanol: Implicación de sus derivados metabólicos</i>	<i>7</i>
2.1. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL: Acetaldehído y Salsolinol	8
2.1.1. ¿Participa el acetaldehído en los efectos neurobiológicos del etanol?	9
2.1.1.a. Metabolismo cerebral del etanol	10
2.1.1.b. Propiedades reforzantes del acetaldehído	13
2.1.1.c. Implicación necesaria del acetaldehído en los efectos neurobiológicos del etanol	16
2.1.2. ¿Participa el salsolinol en los efectos neurobiológicos del etanol?	23
2.1.2.a. Producción y determinación de salsolinol en el cerebro	24
2.1.2.b. Propiedades reforzantes del salsolinol	27
2.1.2.c. Implicación del salsolinol en los efectos neurobiológicos del etanol	30
2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ETANOL Y SUS DERIVADOS EN EL SISTEMA MCLD	32
2.2.1. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL : Región clave de los efectos reforzantes del etanol	33
2.2.1.a. Heterogeneidad de las neuronas del VTA	36
2.2.1.b. Heterogeneidad antero-posterior del VTA	39
2.2.2. Modulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas por el etanol y sus derivados	43
2.2.2.a. Activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA	43
2.2.2.b. Depresión de las neuronas dopaminérgicas del VTA	54

El alcoholismo como una enfermedad crónica: El problema de las recaídas y su tratamiento _____ **56**

2.3. ALCOHOLISMO: El problema de las recaídas _____ **59**

2.3.1. Modelos experimentales para el estudio de las recaídas _____ **61**

2.3.1.a. Modelos de reanudación _____ 61

2.3.1.b. Modelos en los que se evalúa el fenómeno ADE _____ 63

2.4. ARSENAL TERAPÉUTICO EXISTENTE _____ **66**

2.5. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIRECAÍDA _____ **71**

2.5.1. Estrategias terapéuticas en evaluación para el tratamiento de la recaída 72

2.5.2. La inactivación del acetaldehído como una estrategia de tratamiento ___ 75

3. OBJETIVOS _____ **79**

4. MATERIALES Y MÉTODOS _____ **83**

Efectos neuroconductuales del etanol en el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico _____ **85**

4.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL ADMINISTRADO EN VTA: PAPEL DEL ACETALDEHÍDO Y DE LA FRACCIÓN NO METABOLIZADA DEL ETANOL _____ **85**

4.1.1. Animales de experimentación _____ 87

4.1.2. Solución de trabajo y sustancias químicas ensayados _____ 88

4.1.3. Procedimientos experimentales _____ 91

Cirugía estereotáxica y post-cirugía _____ 91

Procedimiento de microinyección _____ 94

Análisis de la actividad motora _____ 95

4.1.4. Planteamiento y diseño experimental _____ 96

Experimento 1: Efectos del secuestro del acetaldehído sobre la activación motora derivada de la administración intra-VTA de etanol _____ 96

Experimentos 2, 3 y 4: Estudio de los efectos del acetaldehído y la fracción no metabolizada del etanol en la actividad de las neuronas dopaminérgicas: Evaluación mediante la conducta motora de la rata _____ 100

Experimento 5: Análisis de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación motora derivada de la administración de etanol _____ 108

Experimento 6: Estudio de la participación de los receptores GABA_A en la inhibición de la conducta exploratoria tras la administración de etanol _____ 110

4.1.5. Validación histológica _____ 114

4.1.6. Expresión de los resultados y análisis estadístico _____ 115

***El secuestro del acetaldehído como una nueva estrategia terapéutica para la prevención de la recaída en el alcoholismo* _____ 117**

4.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIRECAÍDA DE LA D-PENICILAMINA: MEDIDA DEL FENÓMENO ADE EN EL MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE ___ 117

4.2.1. Animales de experimentación _____ 119

4.2.2. Soluciones de trabajo y agente farmacológico ensayados _____ 120

4.2.3. Procedimientos experimentales _____ 121

Autoadministración operante de etanol _____ 121

Análisis de la actividad motora _____ 124

Determinación de los niveles plasmáticos de etanol _____ 125

4.2.4. Planteamiento y diseño experimental _____ 126

Experimento 1: Evaluación del fenómeno ADE en los animales _____ 126

Experimento 2: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica _____ 128

Experimento 3: Efectos de la DP y la autoadministración de etanol en la actividad locomotora _____ 131

Experimento 4: Determinación de los niveles de etanol en plasma _____ 132

4.2.5. Expresión de los resultados y análisis estadístico _____ 134

5. RESULTADOS _____ 137

***Efectos neuroconductuales del etanol en el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico* _____ 139**

5.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL ADMINISTRADO EN VTA: PAPEL DEL ACETALDEHÍDO Y DE LA FRACCIÓN NO METABOLIZADA DEL ETANOL _____ 139

5.1.1. Experimento 1: Efectos del secuestro del acetaldehído sobre la activación motora derivada de la administración intra-VTA_p de etanol _____ 139

Experimento 1A: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTA_p de etanol _____ 139

Experimento 1B: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTA_p de DAMGO _____ 143

5.1.2. Experimentos 2, 3 y 4: Estudio de los efectos del acetaldehído y la fracción no metabolizada del etanol en la actividad de las neuronas dopaminérgicas: Evaluación mediante la conducta motora de la rata _____ 146

Experimento 2: Selección de la dosis de etanol a administrar _____ 146

Experimento 3: Estrategia farmacológica diseñada para incrementar los niveles de acetaldehído en VTA_p _____ 148

Experimento 4: Estrategias farmacológicas diseñadas para reducir los niveles de acetaldehído en VTA_p _____ 151

5.1.3. Experimento 5: Análisis de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación motora derivada de la administración de etanol _____ 158

5.1.4. Experimento 6: Estudio de la participación de los receptores GABA_A en la inhibición de la conducta exploratoria tras la administración de etanol _____ 161

Experimento 6A: Estudio de la administración intra-VTA de bicuculina sobre la actividad motora: Selección de dosis _____ 161

Experimento 6B: Efectos del bloqueo de los receptores GABA_A en la actividad motora, tras la administración de una dosis baja de etanol en diferentes condiciones experimentales _____ 164

El secuestro del acetaldehído como una nueva estrategia terapéutica para la prevención de la recaída en el alcoholismo _____ 169

5.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIRECAÍDA DE LA D-PENICILAMINA: MEDIDA DEL FENÓMENO ADE EN EL MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE _____ 169

5.2.1. Experimento 1: Evaluación del fenómeno ADE en los animales _____ 169

5.2.2. Experimento 2: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica _____ 172

5.2.3. Experimento 3: Efectos de la DP y la autoadministración de etanol en la actividad locomotora _____ 179

5.2.4. Experimento 4: Determinación de los niveles de etanol en plasma _____ 181

6. DISCUSSION _____ 183

Neurobehavioural effects of ethanol in the mesolimbic dopamine system 186

6.1. INVOLVEMENT OF THE BRAIN-GENERATED ACETALDEHYDE IN THE BEHAVIOURAL ACTIVATING EFFECTS EVOKED BY ETHANOL _____ 186

6.2. DOES ETHANOL HAVE A DUAL EFFECT ON THE VTA DOPAMINE NEURON ACTIVITY? _____ 191

6.3. THE DUAL ACTION OF ETHANOL ON THE VTA DOPAMINE NEURON ACTIVITY _____ 194

• Excitatory effects of ethanol _____ 194

• Depressant effects of ethanol _____ 204

Acetaldehyde sequestration as a novel therapeutic strategy for preventing alcohol relapse _____ 209

6.4. EVALUATION OF THE D-PENICILLAMINE EFFICACY IN ETHANOL RELAPSE-LIKE DRINKING FROM AN OPERANT SELF-ADMINISTRATION PARADIGM _____ 210

• Expression of the ADE phenomenon _____ 210

• Re-evaluation of the D-Penicillamine preclinical efficacy as a potential anti-relapse treatment _____ 214

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	221
8. REFERENCES	227

ABREVIATURAS /ABBREVIATIONS

5-HT	: Serotonina	, Serotonine
ACD	: Acetaldehído	, Acetaldehyde
Ach	: Acetilcolina	, Acetylcholine
aCSF	: Fluido cerebroespinal artificial	, Artificial cerebrospinal fluid
ADE	: Alcohol Deprivation Effect	, Alcohol Deprivation Effect
ADH	: Alcohol deshidrogenasa	, Alcohol dehydrogenase
ALDH	: Aldehído deshidrogenasa	, Aldehyde dehydrogenase
aopt	: Tracto óptico accesorio	, Accessory optic tract
AZ	: Azida sódica	, Sodium azide
BIC	: Bicuculina	, Bicuculline
BLA	: Amígdala basolateral	, Basolateral amygdala
CAT	: Catalasa	, Catalase
CeA	: Amígdala central	, Central amygdala
CI/CY	: Cianamida	, Cyanamide
CL	: Núcleo lineal central(caudal)	, Central(Caudal) linear nucleus
cp	: Pedúnculo cerebral	, Cerebral peduncle
CPP	: Condicionamiento de la preferencia de lugar	, Conditioned place preference
CYP2E1	: Citocromo P-4502E1	, Cytochrome P-4502E1
DA	: Dopamina	, Dopamine



Abreviaturas/Abbreviations

DAMGO	: [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-enkephalin	, [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5-ol]-enkephalin
DP	: D-Penicilamina	, D-Penicillamine
ERK	: Quinasas reguladas por señales extracelulares	, Extracellular-signal-regulated kinases
EtOH	: Etanol	, Ethanol
GABA	: Ácido γ -aminobutírico	, γ -aminobutyric acid
Glu	: Glutamato	, Glutamate
HPC	: Hipocampo	, Hippocampus
i.g.	: Intragástrica	, Intragastric
i.p.	: Intraperitoneal	, Intraperitoneal
I_A	: Corriente de K ⁺ tipo A	, A-type K ⁺ current
IF	: Núcleo interfascicular	, Interfascicular nucleus
I_h	: Corriente catiónica activada por hiperpolarización	, Hyperpolarization-activated cation current
IL	: Corteza infralímbica	, Infralimbic cortex
I_M	: Corriente de K ⁺ tipo M	, M-type K ⁺ current
IP/IPN	: Núcleo interpeduncular	, Interpeduncular nucleus
IP₃	: Inositol-1,4,5-trifosfato	, Inositol-1,4,5-trisphosphate
L-cys	: L-Cisteína	, L-Cysteine
LDTg/LDT	: Núcleo tegmental laterodorsal	, Laterodorsal tegmental nucleus
LH	: Hipotálamo lateral	, Lateral hypothalamus
LHb	: Habénula lateral	, Lateral habenula
MCLD	: Sistema mesocorticolímbico dopaminérgico	, Mesolimbic dopamine system

Abreviaturas/Abbreviations

ml	: Lemnisco medial	, Medial lemniscus
MORs	: Receptores opioides de tipo μ	, μ -opioid receptors
mp	: Pedúnculo mamilar	, Mammillary peduncle
mPFC	: Corteza prefrontal medial	, Medial prefrontal cortex
MSN	: Neuronas espinosas medianas	, Medium spiny neurons
NAc	: Núcleo accumbens	, Nucleus accumbens
NAc core	: Núcleo accumbens core	, Nucleus accumbens core
NAc shell	: Núcleo accumbens shell	, Nucleus accumbens shell
NArc	: Núcleo arqueado del hipotálamo	, Hypothalamic arcuate nucleus
Neuronas DA/ DA neurons	: Neuronas dopaminérgicas	, Dopaminergic neurons
Neuronas GABA/ GABA neurons	: Neuronas GABAérgicas	, GABAergic neurons
Neuronas Glu/ Glu neurons	: Neuronas glutamatérgicas	, Glutamatergic neurons
NTX	: Naltrexona	, Naltrexone
OMS/WHO	: Organización Mundial de la Salud	, World Health Organization
PBP	: Área pigmentada parabraquial	, Parabrachial pigmented area
PFC	: Corteza prefrontal	, Prefrontal cortex
PFR	: Área adyacente al fascículo retroflexo	, Parafasciculus retroflexus area
PL	: Corteza prelímbica	, Prelimbic cortex
PN	: Núcleo paranigral	, Paranigral nucleus
Pn	: Núcleo pontino	, Pontine nuclei

Abreviaturas/Abbreviations

PPTg	: Núcleo tegmental pedúnculo pontino	, Pedunculo pontine tegmental nucleus
R	: Núcleo rojo	, Red nucleus
RLi	: Núcleo lineal rostral del raphe	, Rostral linear nucleus raphe
RMTg	: Núcleo tegmental rostromedial	, Rostromedial tegmental nucleus
RRF	: Campo retrorubral	, Retrorubral field
SAL	: Salsolinol	, Salsolinol
scp	: Pedúnculo cerebeloso superior	, Superior cerebellar peduncle
SK	: Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺	, Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ channels
SN	: Substantia nigra	, Substantia nigra
SNc	: Substantia nigra pars compacta	, Substantia nigra pars compacta
SNr	: Substantia nigra pars reticulata	, Substantia nigra pars reticulata
THIQs	: Tetrahydroisoquinolinas	, Tetrahydroisoquinolines
tVTA	: Cola del área tegmental ventral	, Tail of the ventral tegmental area
vHPC	: Hipocampo ventral	, Ventral hippocampus
VP	: Pálido ventral	, Ventral pallidum
VTA	: Área tegmental ventral	, Ventral tegmental area
VTAA/aVTA	: Área tegmental ventral anterior	, Anterior ventral tegmental area
VTAp/pVTA	: Área tegmental ventral posterior	, Posterior ventral tegmental area
β-FNA	: β-Funaltrexamina	, β-Funaltrexamine

GLOSSARY (Glosario)

- 1. Drug (Droga):** A chemical compound or substance that can alter the structure and function of the body. Psychoactive drugs affect the function of the brain. (National Institute on Drug Abuse (NIDA) 2014 (Last updated))
- 2. Psychoactive drug or substance (Droga o sustancia psicoactiva):** A substance that, when ingested, affects mental processes, e.g. cognition or affect. This term and its equivalent, psychotropic drug, are the most neutral and descriptive terms for the whole class of substances, licit and illicit, of interest to drug policy. "Psychoactive" does not necessarily imply dependence-producing, and in common parlance, the term is often left unstated, as in "drug use" or "substance abuse". (World Health Organization 1994)
- 3. Reinforcement (Refuerzo):** The strengthening of stimulus–stimulus, stimulus–response or response–reward associations that results from the timely presentation of a reward. The term applies to both Pavlovian and instrumental conditioning, though it is most frequently used with the latter. (Wise 2004)

Glossary

- 4. Reward (Recompensa):** In the noun form (a reward), an object or event that elicits approach and is worked for; its analogue is 'a reinforcer'. In the verb form (to reward) the term is synonymous with 'to reinforce'. As a verb it is used with respect to instrumental but not Pavlovian conditioning. (Wise 2004)

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el alcoholismo constituye uno de los principales factores de riesgo de enfermedad, discapacidad y muerte. Este hecho, junto al carácter crónico y recidivante de esta adicción, supone un elevado coste social y económico a nivel mundial. Dada esta problemática, múltiples investigaciones se han centrado en mejorar los insatisfactorios tratamientos disponibles hasta la fecha. En especial, los últimos estudios han hecho hincapié en la prevención de las recaídas durante los periodos de abstinencia, el mayor problema a nivel clínico de los individuos alcohol-dependientes.

Sin embargo, los avances en este campo se ven limitados por el escaso conocimiento acerca de las alteraciones que se producen en determinados sistemas cerebrales clave en el desarrollo de la adicción a sustancias en general y al alcohol en particular, principalmente en el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico (MCLD). El paso previo al estudio de estos cambios persistentes generados por el consumo crónico de la droga, sería la descripción del mecanismo de acción de la misma, es decir, intentar conocer cómo el alcohol afecta a la actividad del sistema MCLD. En concreto, el mecanismo a través del cual, el alcohol es capaz de producir la activación de las neuronas dopaminérgicas (neuronas DA) en este sistema. No obstante, como se mostrará más adelante, a pesar del trabajo de investigación desarrollado a lo largo de varias décadas, las bases biológicas que subyacen a los efectos reforzantes del alcohol no se han identificado con certeza. En este sentido, han surgido diferentes corrientes de pensamiento. Algunos autores han indicado que las propiedades reforzantes del alcohol derivan de la interacción de la propia molécula de etanol con diferentes sistemas

Introducción

neuroquímicos, que se han postulado como posibles dianas para el mecanismo de acción de esta droga. Otros, afirman que el acetaldehído (ACD), su principal metabolito, o ciertos derivados de éste como es el salsolinol (SAL), obtenido al conjugarse el ACD con aminas biógenas como la dopamina (DA), juegan un papel clave en la activación de las neuronas DA del sistema MCLD.

Un mayor conocimiento de cómo el etanol o sus derivados contribuyen a las propiedades reforzantes del alcohol, podría constituir un factor esencial para el desarrollo de farmacoterapias más eficaces para el tratamiento del alcoholismo. De hecho, a tenor del amplio *corpus* experimental que acredita la relevancia del ACD en la activación de las neuronas DA tras el consumo de alcohol, y que esta activación es crucial para el desarrollo de la adicción y las recaídas en los pacientes en tratamiento, se ha propuesto a los compuestos capaces de inactivar químicamente al ACD como una prometedora nueva intervención terapéutica en el alcoholismo. Entre estos compuestos, denominados agentes secuestrantes del ACD, se han evaluado a nivel preclínico la L-Cisteína (L-cys) y la D-Penicilamina (DP).

En esta Tesis, se expondrán con detalle las evidencias experimentales obtenidas relativas al mecanismo de acción del etanol a nivel del sistema MCLD, y que avalan la implicación de los productos del metabolismo del etanol en la activación del sistema MCLD tras el consumo de alcohol. Asimismo, se mostrarán los datos preclínicos que sustentan el empleo de los agentes secuestrantes del ACD, como una nueva estrategia terapéutica para la prevención de las recaídas en el alcoholismo.

2. ANTECEDENTES

Explorando las bases biológicas de los efectos reforzantes del etanol: Implicación de sus derivados metabólicos

A pesar de que el consumo de alcohol etílico (etanol) presenta un elevado impacto en la salud de la población mundial y es, probablemente, la droga más consumida (Rehm *et al*, 2011; Rehm and Shield 2013; World Health Organization 2014 ed), a día de hoy todavía no se han podido establecer completamente las bases biológicas de sus efectos reforzantes. Este hecho es debido fundamentalmente a sus características fisicoquímicas tan particulares: es una molécula muy sencilla desde un punto de vista estructural, con un coeficiente de reparto n-octanol/agua idóneo para atravesar sin problemas las membranas celulares y, además, escasamente reactiva. Estas particularidades han dificultado el estudio de su interacción con los elementos celulares que podrían actuar como dianas para desencadenar sus efectos neurofisiológicos y conductuales. Tratando de dar respuesta a esta incógnita han surgido diferentes hipótesis. A continuación, se expondrán aquellos aspectos más relevantes para la comprensión del trabajo realizado en la presente Tesis.

2.1. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL: Acetaldehído y Salsolinol

Aunque algunos autores han planteado que la propia molécula del etanol sería la responsable de todos sus efectos psicofarmacológicos (Eriksson and Sippel 1977; Eriksson *et al*, 1980; Sippel 1974), otras teorías han establecido que el etanol sería un simple profármaco, un precursor de la verdadera entidad activa, cuya actividad dependería totalmente de la acción de sus metabolitos (Karahanian *et al*, 2011; Raskin 1975; Truitt and Walsh 1971). Actualmente, una hipótesis en auge sugiere que los efectos del etanol serían el resultado final de la acción conjunta tanto del etanol, como de sus derivados (Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013c; Israel *et al*, 2015). En este sentido, décadas de investigación han aportado multitud de evidencias experimentales (conductuales, neuroquímicas y electrofisiológicas) que sugieren que el ACD, el principal metabolito del etanol, juega un papel determinante en algunos de los efectos que ejerce el etanol sobre el sistema MCLD, efectos que son cruciales para el desarrollo de la adicción a esta droga. Asimismo, la implicación del SAL, un derivado del ACD, también ha sido estudiada durante años, existiendo en la última década un interés renovado por este compuesto.

En los sucesivos epígrafes se intentará resumir los principales hallazgos que avalan esta hipótesis. No obstante, recientemente se han publicado excelentes revisiones sobre este tema que pueden consultarse para un análisis más detallado (Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013a; 2013c; Hipolito *et al*, 2012; Israel *et al*, 2015).

2.1.1. ¿Participa el acetaldehído en los efectos neurobiológicos del etanol?

Durante décadas, la implicación del ACD como responsable de parte de los efectos del etanol, ha sido un tema de profundo debate en la comunidad científica.

Desde los años 50 del siglo pasado, se conoce la existencia de un metabolismo hepático como parte fundamental de la eliminación del etanol (Jacobsen 1952). El etanol se metaboliza esencialmente por oxidación, transformándose en ACD. Esta transformación está mediada fundamentalmente por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), aunque también participan el citocromo P-4502E1 (CYP2E1) y en menor medida la catalasa (CAT) (Lands 1998; Nelson *et al*, 1993; Ramchandani *et al*, 2001; Tampier and Mardones 1986).

Dado que el incremento de los niveles de **ACD a nivel periférico resulta aversivo** (Chao 1995), hecho que incluso ha resultado útil en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del alcoholismo (disulfiram y cianamida), ciertos autores cuestionaron desde los inicios la idea relativa a la participación del ACD en el desarrollo y mantenimiento del alcoholismo. Además, si el ACD participa como mediador de los efectos excitatorios del etanol sobre el sistema MCLD, debería acceder en cantidad suficiente al sistema nervioso central tras su formación a nivel hepático. Este aspecto ha sido el principal motivo de controversia entre los investigadores a favor y en contra de la relevancia del ACD. Una de las principales causas de este debate fue la demostración de la presencia de la enzima que metaboliza el ACD a

Antecedentes

acetato, la aldehído deshidrogenasa (ALDH), tanto en el hígado como en la barrera hematoencefálica. Ello suponía la existencia de una barrera metabólica altamente eficaz que evitaba que el ACD formado a nivel sistémico, accediese al cerebro (Deitrich *et al*, 1978; Eriksson and Sippel 1977; Hipolito *et al*, 2007; Zimatkin 1991). De hecho, ciertas evidencias experimentales mostraban que para poder atravesar la barrera hematoencefálica, el ACD necesitaba alcanzar concentraciones sanguíneas superiores a 100 μM (Tabakoff *et al*, 1976). Sin embargo, tras la administración aguda de etanol, los niveles de ACD en sangre son 10 veces inferiores a la concentración antes mencionada, siendo además difícilmente detectables en la mayoría de las ocasiones (Eriksson and Fukunaga 1993). Por tanto, diversos datos experimentales parecían sugerir que el ACD no podía ser el responsable de los efectos del etanol sobre el sistema MCLD, salvo que pudiera ser originado en el cerebro, es decir, que el etanol pudiera biotransformarse *in situ* en el cerebro, generando allí el ACD.

2.1.1.a. Metabolismo cerebral del etanol

Fue a principios de los años 70 cuando Raskin y Sokoloff (Raskin and 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, la ADH. Fue 10 años más tarde cuando Cohen y colaboradores (Cohen *et al*, 1980) demostraron que el ACD podía generarse en el cerebro

mediante la acción de la CAT. Desde estos hallazgos, la presencia de estos sistemas enzimáticos en el cerebro ha sido demostrada en repetidas ocasiones y por diferentes laboratorios (Aragon *et al*, 1991; 2002; Gill *et al*, 1992; Hipolito *et al*, 2007; Sanchez-Catalan *et al*, 2008; Zimatkin *et al*, 2006).

Actualmente, como muestra la *Figura 2.1*, se sabe que son tres los sistemas enzimáticos involucrados en la biotransformación del etanol: la ADH, el CYP2E1 y la CAT. Todos ellos participan, en distinta medida, no solo en el metabolismo hepático del etanol sino, también, en el cerebral.

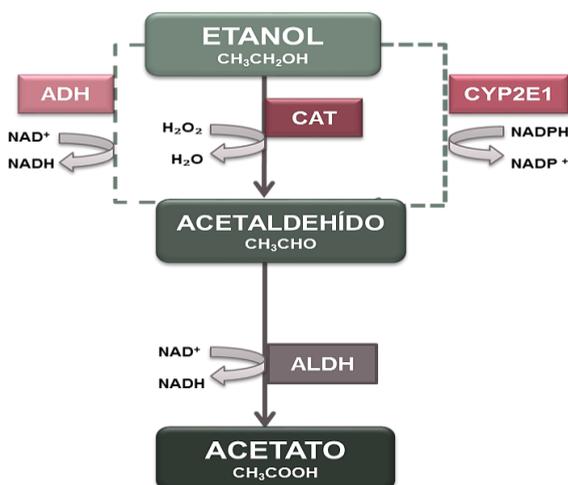


Figura 2.1. Representación gráfica de los mecanismos enzimáticos responsables del metabolismo del etanol. La línea continua (—) indica la vía mayoritaria, mientras que la línea discontinua (---) indica las vías minoritarias, en el cerebro.

Antecedentes

En el **cerebro**, la **ADH contribuye de forma minoritaria** al metabolismo del etanol, tal y como algunos estudios bioquímicos (Zimatkin *et al*, 2006) y conductuales (Escarabajal and Aragon 2002a; 2002b) han mostrado, mientras que en el hígado es la principal enzima metabolizadora. Asimismo, el sistema enzimático **CYP2E1** (Bhagwat *et al*, 1995) es el responsable de aproximadamente el **20 %** del metabolismo cerebral del etanol (Zimatkin *et al*, 2006). Recordemos que a nivel hepático, el CYP2E1 constituye también el segundo sistema en importancia tras la ADH. Por último, la **CAT**, que no parece tener una gran implicación en el metabolismo hepático bajo condiciones fisiológicas (Tampier and Mardones 1987), se ha propuesto como el **principal sistema responsable del metabolismo cerebral del etanol**, participando en, aproximadamente, el **60 %** de la oxidación de etanol a ACD (Zimatkin *et al*, 2006).

A día de hoy, la comunidad científica acepta, sin apenas discrepancias, que **el ACD, se puede generar en el cerebro tras el consumo de etanol** con la participación principal de la CAT y el CYP2E1, habiéndose demostrado incluso la presencia de estos sistemas enzimáticos en regiones tan cruciales para el desarrollo de los trastornos adictivos como las distintas áreas que componen el sistema MCLD (Aragon *et al*, 1992; Hipolito *et al*, 2007; Sanchez-Catalan *et al*, 2008; Zimatkin *et al*, 2006).

Una vez solventado este primer escollo, el siguiente paso para los investigadores que apoyaban la idea de la participación del ACD en los efectos del etanol sobre el sistema MCLD era demostrar que, efectivamente, el ACD generado a partir del etanol constituye un elemento imprescindible en los efectos neurobiológicos provocados por dicha droga.

2.1.1.b. Propiedades reforzantes del acetaldehído

Numerosos estudios muestran que el ACD, administrado tanto periféricamente como inyectado directamente en el cerebro de roedores, posee propiedades reforzantes y es capaz de provocar respuestas conductuales similares a las producidas por el etanol (Correa *et al*, 2012; Quertemont *et al*, 2005). De hecho, las propiedades de refuerzo generalmente atribuidas al etanol podrían ser, en realidad, debidas a su primer metabolito (Brown *et al*, 1979; Neuroactive metabolites of ethanol 2014).

En concreto, su administración periférica en ratas induce condicionamiento de la preferencia de lugar (CPP) (Peana *et al*, 2008; Quertemont and De Witte 2001; Quintanilla and Tampier 2003), aversión condicionada al gusto (Aragon *et al*, 1986; Brown *et al*, 1978; Escarabajal and Aragon 2003; Kunin *et al*, 2000; Quintanilla *et al*, 2002) y autoadministración (Myers *et al*, 1982; 1984; Peana *et al*, 2010b; Takayama and Uyeno 1985). Además, se ha demostrado que su administración cerebral también induce CPP (Quertemont and De Witte 2001; Quintanilla *et al*, 2002; Smith *et al*, 1984), aversión condicionada al gusto (Aragon *et al*, 1986; Brown *et al*, 1978), autoadministración (Amit *et al*, 1977; Brown *et al*, 1980; McBride *et al*, 2002; Rodd *et al*, 2005; Rodd-Henricks *et al*, 2002), incrementa la preferencia y el consumo de etanol (Brown *et al*, 1980; 1979), e induce estimulación motora (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006; Correa *et al*, 2003a; 2003b; 2009; Pastor and Aragon 2008; Sanchez-Catalan *et al*, 2009).

Respecto a este último punto, se ha demostrado que tanto los efectos del ACD como los del etanol, sobre la actividad locomotora de los animales

Antecedentes

de laboratorio, dependen fundamentalmente de la especie animal y de la vía de administración utilizada. En general, la **administración sistémica de etanol** ha sido ampliamente usada en los estudios desarrollados con **ratones**. El etanol administrado sistémicamente genera **efectos estimulantes locomotores** en la mayoría de estirpes de ratón, excepto en algunas estirpes como por ejemplo los C57/BL6 (Correa *et al*, 2004b). Por el contrario, su administración sistémica da lugar, en general, a **depresión motora en la mayoría de estirpes de rata** (Aragon *et al*, 1989; Chuck *et al*, 2006; Correa *et al*, 2003a; Duncan and Cook 1981; Gingras and Cools 1996; Moore *et al*, 1993; Sanchis-Segura *et al*, 2005), e incluso a fenómenos de pérdida de reflejos posturales y sedación cuando las dosis administradas son elevadas (> 2-3 g/kg) (Paez and Myers 1990; Tampier and Quintanilla 2005; Webb *et al*, 2002). Sin embargo, existen algunos estudios que demuestran que la administración sistémica puede dar lugar a estimulación motora en determinadas estirpes de rata, por ejemplo, en ratas alcohol-preferentes tras el consumo voluntario de etanol (Colombo *et al*, 1998; Paivarinta and Korpi 1993) o tras la administración intraperitoneal (i.p.) (Rodd *et al*, 2004a; Waller *et al*, 1986), así como en crías de Sprague-Dawley tras la administración intragástrica (i.g.) (Pautassi *et al*, 2011). En cualquier caso, y tal como se ha indicado anteriormente, la **administración intracerebral** de ambos compuestos produce **estimulación motora en ratas**.

En relación a las propiedades reforzantes del ACD y dada su relevancia en el contexto que nos ocupa, quisiéramos destacar algunos estudios. El primero de ellos corresponde al artículo publicado por Correa y colaboradores en 2003 (Correa *et al*, 2003b). En él, los autores demostraron

que la administración intracerebroventricular de ACD producía una clara activación locomotora, originando curvas dosis-respuesta en forma de U invertida, muy similares a las obtenidas para el etanol. El segundo estudio, fue publicado en 2006 por Arizzi y colaboradores (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006) y en él se identificaba, por primera vez, una región cerebral, la *substantia nigra pars reticulata* (SNr), en la que tanto el ACD como el etanol desencadenaban respuestas motoras similares, tras la administración de dosis del mismo orden. Desde entonces, se han identificado dos regiones más del cerebro que pueden actuar como áreas potenciales para el desarrollo de los efectos estimulantes del etanol y el ACD: el núcleo arqueado del hipotálamo (NArc) (Correa *et al*, 2009; Pastor and Aragon 2008), y el área tegmental ventral posterior (VTAp) (Sanchez-Catalan *et al*, 2009).

Asimismo, **estudios neurobiológicos** han mostrado que el ACD, administrado tanto por vía i.g. como directamente en el área tegmental ventral (VTA) por microinyección o retrodiálisis, es capaz de **incrementar la liberación de DA en el núcleo accumbens shell (NAc shell)** (Deehan *et al*, 2013b; Enrico *et al*, 2009; Melis *et al*, 2007). Además, el ACD es capaz de **estimular la actividad de las neuronas DA del VTA**, tanto *in vitro* (Diana *et al*, 2008; Melis *et al*, 2007), como *in vivo* (Enrico *et al*, 2009; Foddai *et al*, 2004), tal y como hace el etanol, pero a concentraciones muy inferiores a las de la droga precursora.

A tenor de lo expuesto, **la administración de ACD es capaz de desencadenar efectos análogos a los producidos por el etanol aunque, en algunos casos, a concentraciones inferiores.** No obstante, este tipo de

Antecedentes

evidencias, aun siendo importantes, no demuestran que el ACD sea un elemento **necesario** para la aparición de estos efectos tras la administración de etanol. Para ello, es necesario un enfoque diferente, tal y como se mostrará a continuación.

2.1.1.c. Implicación necesaria del acetaldehído en los efectos neurobiológicos del etanol

A pesar del debate suscitado, en los últimos años diversos grupos de investigación han demostrado claramente no solo que el ACD es psicofarmacológicamente activo a nivel central, sino que su génesis es **necesaria** para que el etanol manifieste algunos de sus efectos, tanto conductuales como neurofisiológicos, empleando diferentes estrategias farmacológicas que a continuación comentaremos (para una revisión reciente ver Correa *et al*, 2012; 2014; Deehan *et al*, 2013a; Israel *et al*, 2015).

- **Modulación del metabolismo cerebral del etanol**

La manipulación de la actividad (tanto la inhibición como la promoción) de los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo cerebral del etanol, ha sido la estrategia más ampliamente utilizada para demostrar la implicación del ACD en la génesis de los efectos del etanol, sobre el sistema MCLD (Correa *et al*, 2012; Deitrich 2004; Hipolito *et al*, 2007). Dada su importancia en el metabolismo cerebral del etanol, la manipulación de la

actividad de la **CAT** ha sido la táctica mayoritaria, aunque no la única. En este sentido, citaremos los resultados de algunos **estudios conductuales** recientes que utilizan **inhibidores de esta enzima**. Así, se comprobó que la administración sistémica de **azida sódica** (AZ) en ratas (tratamiento que fue capaz de disminuir hasta en un 40 % la actividad de la CAT cerebral) previene la activación locomotora inducida por la administración intra-SNr de etanol (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006). Este mismo tratamiento, administrado tanto periférica como localmente en el cerebro (intracerebroventricular e intra-NArc), previene la depresión motora inducida por la inyección i.p. de etanol en ratas (Sanchis-Segura *et al*, 2005). 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 en ratas (Pastor and Aragon 2008), y el efecto depresor motor derivado de la inyección i.p. de etanol en ratas (Aragon *et al*, 1989).

La situación contraria, es decir, la promoción de la conversión metabólica del etanol en ACD mediante el **incremento de la actividad** de la **CAT**, aumenta los efectos estimulantes motores del etanol. Así, la administración aguda de **acetato de plomo** se traduce en una potenciación de los efectos estimulantes motores del etanol, tras la administración i.p. en ratones Swiss (Correa *et al*, 1999; 2004b; 2005). De forma similar, la administración de **ácido 3-nitropropiónico** también conduce a un aumento de los efectos psicoestimulantes del etanol en ratones (Manrique *et al*, 2006). Otra metodología para aumentar el metabolismo del etanol, ha consistido en el incremento de los niveles de H₂O₂ (co-sustrato de la enzima CAT) mediante hiperoxia normobárica. Esta aproximación también se ha traducido en un

Antecedentes

aumento de la respuesta motora al etanol tras la administración del mismo en ratones (Pastor *et al*, 2002).

Mediante una aproximación diferente, se ha demostrado que tras la administración sistémica de etanol, el bloqueo del metabolismo del ACD por parte de la ALDH mediante inhibidores como cianamida (CI), disulfiram o dietilditiocarbamato, produce los efectos derivados del incremento de los niveles periféricos de ACD, en este caso, una reducción de la actividad motora en ratas y ratones (Escarabajal and Aragon 2002a; 2002b; 2003; Spivak *et al*, 1987).

El estudio de la influencia que las manipulaciones enzimáticas de la CAT ejercen en el consumo voluntario de etanol en ratones ha dado lugar a resultados dispares: mientras que algunos autores observan que la inhibición de la actividad de la CAT mediante el aminotriazol o la reducción de los niveles de H₂O₂, tras la administración de ebselen o de ácido α -lipoico, reducen el consumo (Koechling and Amit 1994; Ledesma *et al*, 2014), otros postulan que la administración aguda de acetato de plomo (que incrementa la actividad de la CAT) reduce también la ingesta (Correa *et al*, 2004a). Sin embargo, en ratas se ha mostrado una relación directa entre la actividad de esta enzima y el consumo voluntario de etanol (Amit and Aragon 1988; Aragon *et al*, 1985; Gill *et al*, 1996). Así, se ha demostrado que la microinyección en VTA de lentivirus que codifican anti-CAT shRNA (lo cual reduce el contenido en CAT), o lentivirus que codifican la expresión de la ALDH 2, disminuyen el consumo voluntario así como la aparición del fenómeno ADE (del inglés *Alcohol Deprivation Effect*) representativo de las recaídas, como más tarde se indicará, en ratas alcohol-preferentes (UChB)

(Karahanian *et al*, 2011; 2015; Tampier *et al*, 2013). También se ha establecido una correlación positiva entre la actividad de la ALDH en el cerebro y el consumo voluntario de etanol en ratas (Sinclair and Lindros 1981; Socaransky *et al*, 1984).

Por último, cabe mencionar diversos **estudios electrofisiológicos y neuroquímicos** que también han demostrado la **necesidad del ACD en la activación de las neuronas DA del VTA por parte del etanol**. En concreto, Foddai y colaboradores (Foddai *et al*, 2004) demostraron que la administración de un antagonista de la ADH (4-metilpirazol), fue capaz de impedir la activación de las neuronas DA producida por el etanol aunque, no tuvo ningún efecto sobre la generada por el ACD. El uso de esa misma estrategia consiguió prevenir la liberación de DA en NAc shell, tras la administración i.g. de etanol (Diana *et al*, 2008; Melis *et al*, 2007). La inhibición de la CAT fue también capaz de suprimir la activación de las neuronas del sistema MCLD producida por el etanol (Diana *et al*, 2008; Melis *et al*, 2007).

- **Agentes secuestrantes del acetaldehído: Una estrategia alternativa**

La estrategia alternativa para demostrar la implicación del ACD en el desarrollo de los efectos psicoactivos del etanol, consiste en el empleo de los llamados agentes secuestrantes del ACD. Con el manejo de estas sustancias se pretende **“inactivar”, desde el punto de vista químico, el ACD que haya podido generarse tras el metabolismo del etanol**. Para este fin, se han

Antecedentes

utilizado dos aminoácidos azufrados: **la DP y la L-cys**. Estos compuestos interactúan, de forma no enzimática, con el ACD para formar aductos estables e inactivos (Kera *et al*, 1985; Nagasawa *et al*, 1980) que han podido detectarse, para el caso de la DP ((4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid), en plasma, hígado y cerebro de rata tras la administración de etanol (Serrano *et al*, 2007).

En relación a los estudios conductuales que utilizan la **DP**, cabe destacar que este agente secuestrante se ha mostrado **capaz de reducir las distintas respuestas conductuales provocadas por el etanol**. Así, Font y colaboradores (Font *et al*, 2005) demostraron que el pretratamiento i.p. con DP es capaz de reducir, de forma dosis-dependiente, la estimulación motora generada por la administración de etanol en ratones, sin afectar a la estimulación generada por la cocaína o la cafeína, mostrando claramente la especificidad de acción de este aminoácido. Estos mismos autores, mostraron posteriormente que el pretratamiento i.p. con DP también atenúa los efectos ansiolíticos (Correa *et al*, 2008) y el desarrollo del CPP generado por la administración i.p. de etanol en ratones (Font *et al*, 2006a; Ledesma *et al*, 2013). Del mismo modo, en ratas, previene el desarrollo del CPP inducido por la administración i.g. de etanol (Peana *et al*, 2008). En ratas recién nacidas, se ha observado que la administración intracisternal e i.p. de DP inhibe el condicionamiento de lugar y la activación motora inducidos por la administración, también intracisternal e i.g. de etanol (March *et al*, 2013; Pautassi *et al*, 2011).

Por otra parte, se ha analizado el efecto de la DP en el consumo voluntario de etanol. Los resultados mostraron que este agente secuestrante

es capaz de producir una **disminución de la ingesta de etanol**, en ratas Long Evans, cuando se administra intracerebroventricularmente (Font *et al*, 2006b). Asimismo, nuestro grupo ha demostrado que la DP, administrada de forma subcutánea e intra-VTA, es capaz de **prevenir la aparición del fenómeno ADE** en ratas Wistar (Orrico *et al*, 2013; 2014a).

El otro secuestrante, la L-cys, también es **capaz de prevenir algunas de las respuestas conductuales desencadenadas por el etanol**. Peana y colaboradores mostraron que este aminoácido es capaz de prevenir, de forma dosis-dependiente, el desarrollo del CPP observado tras la administración i.g. de etanol sin modificar el CPP inducido por morfina, confirmando así la especificidad de este aminoácido (Peana *et al*, 2009). Sin embargo, en un estudio publicado en 2001 se observó que, el pretratamiento i.p. con L-cys 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. de etanol en ratones (Escarabajal *et al*, 2001). Según estos autores, 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 del secuestro del ACD (Nagasawa *et al*, 1984). De hecho, los autores propusieron que **el aducto formado entre el ACD y la L-cys sería inestable**, de modo que podría liberar de forma prolongada y diferida en el tiempo el ACD inicialmente secuestrado, pudiendo así mantener los niveles de ACD en el cerebro elevados durante más tiempo, es decir, el aducto podría actuar como una fuente inesperada y no deseada de ACD libre (Nagasawa *et al*, 1984).

Antecedentes

No obstante, por otra parte se ha demostrado que la L-cys, administrada i.p. en ratas, es capaz de **reducir** tanto la **autoadministración de etanol** (adquisición y mantenimiento), **como la reanudación** en la ingesta de etanol tras la fase de extinción, un modelo considerado por muchos autores como un buen indicador de la búsqueda de la droga y la recaída, como se expondrá posteriormente (Peana *et al*, 2010a; 2013a). Además, este aminoácido también fue capaz de reducir la **adquisición, mantenimiento y el efecto de la privación en la autoadministración oral de ACD** (Peana *et al*, 2012).

Por último, estudios neuroquímicos y electrofisiológicos también han mostrado que la inactivación química del ACD por la DP y la L-cys es capaz de **suprimir la liberación de DA en el NAc shell inducida tanto por el etanol como por el ACD**, así como la **excitación de las neuronas DA del VTA producida por el etanol** (Enrico *et al*, 2009; Sirca *et al*, 2011).

En resumen, los resultados de estos estudios permiten establecer la base científica que soportaría **el empleo de los agentes secuestrantes del ACD, como una nueva estrategia terapéutica en la prevención de las recaídas en el alcoholismo**. De hecho, existe un consenso entre los investigadores anteriormente citados de que esta estrategia terapéutica, potencialmente útil, merece más atención e investigación. Esta alternativa se explorará en la presente Tesis, como se detalla más adelante.

2.1.2. ¿Participa el salsolinol en los efectos neurobiológicos del etanol?

A pesar de todas las evidencias a favor del papel del ACD en los efectos conductuales y neuroquímicos del etanol, se debe considerar que el ACD tiene una semivida corta y es un compuesto muy reactivo (Correa *et al*, 2012; Myers *et al*, 1982). Por ello, es capaz de reaccionar con diversas moléculas endógenas, como las aminas biógenas, dando lugar a diferentes compuestos biológicamente activos (Cohen and Collins 1970; Cohen 1976; Davis and Walsh 1970; Walsh *et al*, 1970) que también podrían participar en los efectos del etanol. Las **tetrahydroisoquinolinas** (THIQs), resultantes de la condensación del ACD con las monoaminas (DA, epinefrina y norepinefrina), han centrado la mayoría de las investigaciones. Específicamente, el SAL (1-metil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina), formado por la reacción del ACD con la DA (Collins and Bigdeli 1975), ha sido el derivado más estudiado en relación a su contribución en los efectos reforzantes del etanol (Deehan *et al*, 2013c; Hipolito *et al*, 2012; Israel *et al*, 2015; Lee *et al*, 2010).

Hace aproximadamente 40 años, las evidencias experimentales llevaron a plantear la conocida como “teoría THIQs del alcoholismo” (Cohen and Collins 1970; Davis and Walsh 1970; Duncan and Deitrich 1980; Melchior and Myers 1977). Sin embargo, a final de los años 80 y principio de los 90, la implicación de las THIQs y concretamente del SAL, fue motivo de polémica y de rechazo entre la comunidad científica dedicada al estudio del alcoholismo (Hipolito *et al*, 2012). La dificultad para detectar el SAL en el cerebro tras la administración de etanol supuso el principal motivo de controversia

Antecedentes

(Baum *et al*, 1999; Matsubara *et al*, 1987; Myers *et al*, 1985; Sjoquist *et al*, 1982a). Sin embargo, en los últimos años ha renacido el interés por esta teoría gracias a la mejora de las técnicas analíticas (DeCuypere *et al*, 2008; Rojkovicova *et al*, 2008; Starkey *et al*, 2006) y a los nuevos resultados obtenidos.

A continuación, se intentará resumir los principales hallazgos que avalan la participación del SAL en los efectos psicofarmacológicos del etanol.

2.1.2.a. Producción y determinación de salsolinol en el cerebro

Si el SAL está implicado en las consecuencias bioquímicas y conductuales derivadas del etanol, debería formarse tras la ingestión o la administración de esta droga.

Actualmente, se acepta la existencia de dos mecanismos para la **formación endógena de SAL en el cerebro**: (i) mediante condensación no enzimática de Pictet-Spengler del ACD con la DA, dando lugar a una mezcla racémica de (R)-SAL + (S)-SAL, y (ii) mediante reacción enzimática, con la intervención de la (R)-SAL sintasa, originando únicamente el enantiómero (R)-SAL (*Figura 2.2*) (Dostert *et al*, 1990; Haber *et al*, 1996; Hipolito *et al*, 2012; Naoi *et al*, 1996). Así, estos mecanismos podrían permitir la formación de SAL tras la administración de etanol. Además, se ha observado que la obtención de SAL en el cerebro depende de la concentración relativa de ACD

y DA (Jamal *et al*, 2003a; 2003b; 2003c; Wang *et al*, 2007). De hecho, Jamal y colaboradores demostraron, tras la administración de etanol, un incremento en los niveles de SAL en estriado y núcleo *accumbens* (NAc), cuando los niveles de ACD se elevaron debido al pretratamiento de las ratas con CI (un potente inhibidor de la ALDH). Asimismo, mostraron una correlación entre los niveles cerebrales de SAL y las concentraciones sanguíneas de ACD. Sin embargo, tras inhibir a la ADH, no fueron capaces de detectar el SAL (Jamal *et al*, 2003a; 2003b; 2003c).

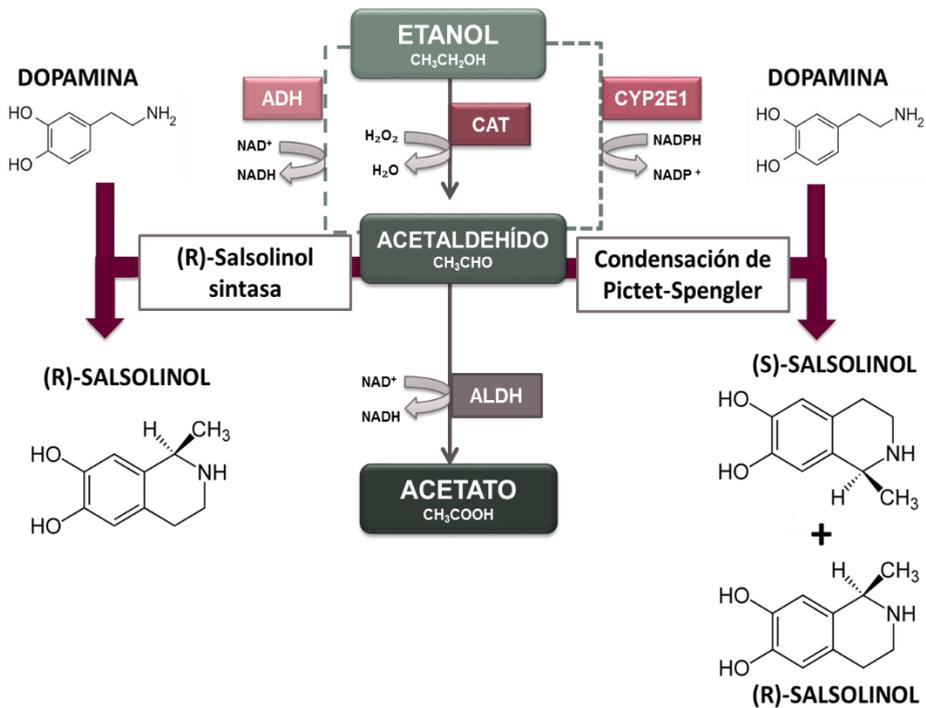


Figura 2.2. Representación gráfica de la síntesis de salsolinol en el cerebro.

Antecedentes

A pesar de estas evidencias, los estudios realizados sobre la determinación de SAL tras la administración/ingestión de etanol, han arrojado resultados dispares. En los años 70, Collins y colaboradores mostraron por primera vez en ratas la presencia de SAL en diferentes áreas cerebrales tras la administración de etanol (Collins and Bigdeli 1975). Desde entonces, múltiples estudios en humanos y roedores han intentado establecer una relación entre el etanol y la presencia de SAL en los fluidos biológicos y cerebro con resultados muy variables (para una revisión reciente ver Hipolito *et al*, 2012). Las diferencias encontradas en la bibliografía pueden ser debidas a la diversidad de protocolos empleados en la toma de muestras, a las técnicas analíticas, a la falta de control sobre las variables que pudieran afectar al resultado (por ejemplo, la dieta) y a las diferentes áreas examinadas. No obstante, sí se ha establecido cierta **correlación** entre el etanol administrado/ingerido y los niveles de SAL determinados en **orina** (Adachi *et al*, 1986; Collins *et al*, 1979; Matsubara *et al*, 1985), **plasma** (Faraj *et al*, 1989; Haber *et al*, 1996; Rommelspacher *et al*, 1995) y **cerebro** (Collins and Bigdeli 1975; Collins *et al*, 1990; Jamal *et al*, 2003a; 2003b; 2003c; Matsubara *et al*, 1987; Myers *et al*, 1985; Sjoquist *et al*, 1982a; 1982b).

En conjunto, todos estos hallazgos parecen apoyar la hipótesis de que el SAL podría formarse tras la administración de etanol y podría estar implicado en la capacidad reforzante del etanol.

2.1.2.b. Propiedades reforzantes del salsolinol

Aunque hasta hace relativamente poco tiempo el único SAL disponible en investigación consistía en una mezcla de (RS)-SAL (~85%) + (RS)-isoSAL (10-15%), recientemente se ha empezado a comercializar un nuevo (RS)-SAL puro, sin isoSAL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tx). Esto ha permitido analizar si las propiedades reforzantes observadas eran o no, debidas al SAL. Dado que los resultados obtenidos con el compuesto puro han sido similares a los obtenidos con el compuesto que contenía isoSAL, demostrando así que el compuesto activo es el (RS)-SAL (Quintanilla *et al*, 2014), la denominación SAL hará referencia a ambos compuestos con el fin de facilitar la exposición.

Hecha esta matización, pasaremos a revisar los estudios más relevantes que han mostrado que este derivado del etanol posee propiedades reforzantes, y es capaz de provocar **respuestas conductuales** análogas a las producidas por el etanol, aunque a concentraciones inferiores (Deehan *et al*, 2013c; Hipolito *et al*, 2012; Israel *et al*, 2015).

Del mismo modo que ocurría con sus compuestos precursores, los resultados obtenidos respecto a la actividad locomotora han mostrado también diferencias en función de la dosis o especie utilizada. Así, salvo alguna excepción (Blum *et al*, 1978), los estudios iniciales mostraron que la administración intracerebral en ratones alcohol-preferentes de dosis elevadas de SAL induce depresión motora (Church *et al*, 1976; 1977; Smolen and Collins 1984), mientras que dosis bajas incrementan la actividad motora (Smolen and Collins 1984). Estudios más recientes, tanto en ratas alcohol-preferentes como no preferentes, indican que la administración intra-VTA de

Antecedentes

SAL produce, de forma dosis-dependiente, un incremento de la actividad motora (Hipolito *et al*, 2010; Quintanilla *et al*, 2014). En un estudio publicado en el 2014, Quintanilla y colaboradores mostraron que la administración i.p. de SAL produce un incremento de la actividad locomotora en ratas preferentes (Quintanilla *et al*, 2014). Sin embargo, cabe destacar que estudios previos en ratas no preferentes (Antkiewicz-Michaluk *et al*, 2000) y ratones (Vetulani *et al*, 2001), no se habían observado cambios en la actividad basal de los animales tras la administración de este compuesto. Además, la administración repetida de SAL y del enantiómero (R)-SAL, tanto por vía i.p. como intra-VTA, produce sensibilización locomotora (Hipolito *et al*, 2010; Quintanilla *et al*, 2014; 2015). Asimismo, la administración i.p. e intra-VTA en ratas, preferentes y no preferentes, de SAL y (R)-SAL produce CPP (Hipolito *et al*, 2011; Matsuzawa *et al*, 2000; Quintanilla *et al*, 2014; 2015). Sin embargo, el enantiómero (S)-SAL no indujo ni sensibilización locomotora, ni CPP, indicando que es el (R)-SAL quien, estereoespecíficamente, induce dichas acciones (Quintanilla *et al*, 2014; 2015).

Igualmente, se ha mostrado que el SAL es autoadministrado directamente en el NAc shell de ratas alcohol-preferentes (Rodd *et al*, 2003) y en el VTAp de ratas no preferentes (Rodd *et al*, 2008). En todos los casos, se ha observado una **relación dosis-respuesta en forma de U invertida**, tal y como ocurría con el etanol y el ACD, **pero a dosis inferiores**.

Además, diferentes estudios han puesto en evidencia que la administración intracerebroventricular de SAL produce un aumento en la preferencia y consumo de etanol (Duncan and Deitrich 1980; Myers and

Oblinger 1977; Myers and Melchior 1977), mientras que la administración i.p. de SAL, así como la administración intra-VTA de SAL y (R)-SAL, producen un incremento en el consumo voluntario de etanol (Quintanilla *et al*, 2014; 2015).

Por otro lado, **estudios neuroquímicos** han demostrado que el SAL administrado directamente en VTA por microinyección o en NAc mediante retrodiálisis, es capaz de **incrementar la liberación de DA en NAc shell** (Deehan *et al*, 2013b; Hipolito *et al*, 2009; 2012), aunque no en núcleo *accumbens core* (NAc core) (Hipolito *et al*, 2009). Diversos autores también han puesto en evidencia que el SAL es capaz de **estimular la actividad de las neuronas DA del VTA, in vitro** (Melis *et al*, 2015; Xie *et al*, 2012; Xie and Ye 2012).

En resumen, a pesar de haber recibido menos atención que el ACD, numerosos estudios demuestran que **la administración de SAL es capaz de inducir la activación del sistema MCLD, así como desencadenar efectos conductuales análogos a los producidos por el etanol y el ACD, pero a dosis inferiores.**

Antecedentes

2.1.2.c. Implicación del salsolinol en los efectos neurobiológicos del etanol

Como se ha mencionado anteriormente, ya sea por las dificultades analíticas o por el desinterés que durante muchos años ha sufrido la teoría THIQs, hasta este mismo año no se había establecido ninguna relación directa entre este compuesto y los efectos neuroconductuales del etanol. Si bien, se debe considerar que teniendo en cuenta que la formación de SAL requiere de la existencia de ACD, el *corpus* de datos experimentales expuesto previamente podría actuar como una evidencia, aunque indirecta, de la participación del SAL.

En apartados anteriores, se ha puesto de manifiesto las dificultades que han existido para relacionar la administración de etanol con el incremento de los niveles de SAL en cerebro y fluidos biológicos, aunque también se ha indicado la existencia de ciertos resultados positivos en ese sentido (ver **apartado 2.1.2.a**, Hipolito *et al*, 2012). No obstante, ha sido este año cuando Melis y colaboradores (Melis *et al*, 2015) han mostrado el **papel clave del SAL en la excitación de las neuronas DA del VTAp por parte del etanol**. En este estudio *in vitro*, tanto el etanol como el ACD, fueron incapaces de estimular la actividad de las neuronas DA en ausencia de DA en el medio debido al pretratamiento de los ratones con α -metil-p-tirosina (un inhibidor de la síntesis y liberación de DA) o reserpina (un inhibidor de la recaptación de monoaminas que produce la depleción de las vesículas). Sin embargo, en esas mismas condiciones, la aplicación de SAL al medio si fue capaz de excitar a las neuronas DA del VTAp. Además, el etanol requirió ser oxidado a ACD para producir la excitación neuronal. Así, la inhibición del sistema H₂O₂-CAT

responsable del metabolismo del etanol, bien por inhibición de la enzima (3-amino-1,2,4-triazol) o por el secuestro del coenzima de dicha enzima, H₂O₂ (ácido α -lipoico), evitó que el etanol activase a las neuronas DA, a pesar de la presencia DA en el medio. Asimismo, tras aplicar etanol a los cortes cerebrales, únicamente en presencia de DA fueron capaces de detectar SAL en el fluido cerebroespinal artificial.

De esta forma, este estudio constituye la **primera evidencia directa de la relación existente entre el etanol y sus derivados, ACD y SAL, en relación a la excitación del sistema MCLD, un aspecto que se considera clave para el desarrollo de las propiedades reforzantes del etanol.**

2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ETANOL Y SUS DERIVADOS EN EL SISTEMA MCLD

Tras revisar la relevancia de los derivados del etanol en sus efectos neuroconductuales, en esta sección se incluye 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 en esta Tesis (para un análisis en profundidad del VTA, ver *The Ventral Tegmentum and Dopamine* 2014). A continuación, se expondrán algunas de las evidencias que han surgido en torno al posible mecanismo de acción del etanol y que creemos, ayudarán a comprender mejor algunos aspectos que aparecerán en secciones posteriores de esta Tesis.

2.2.1. ÁREA TEGMENTAL VENTRAL : Región clave de los efectos reforzantes del etanol

El sistema MCLD, se considera el sustrato neuroanatómico esencial para el desarrollo de los efectos reforzantes de las drogas, incluido el etanol (Koob and Volkow 2010). Este sistema consiste en un conjunto de neuronas que se originan en el mesencéfalo, concretamente en el VTA, y que proyectan a diversas estructuras del sistema límbico, como el NAc, la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala, entre otras (Fields *et al*, 2007; Lindvall *et al*, 1974; Lindvall and Bjorklund 1978; Swanson 1982). Estas neuronas se activan directa o indirectamente tanto por las diferentes drogas, como por los reforzantes naturales (Ikemoto and Bonci 2014; Koob and Le Moal 2006; Wise and Bozarth 1987).

Desde que Tsai (Tsai 1925) identificara el “núcleo tegmental ventral”, la definición de esta heterogénea área cerebral se ha ido modificando a lo largo de la historia. Así, a día de hoy, la concepción más aceptada 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 VTA (tVTA) (Bourdy and Barrot 2012; Ikemoto 2007; Kaufling *et al*, 2009; Perrotti *et al*, 2005) o núcleo tegmental rostromedial (RMTg) (Jhou *et al*, 2009a; 2009b; Lavezzi and Zahm 2011). El núcleo lineal central (CL), el núcleo interfascicular (IF) y el núcleo lineal rostral del raphe (RLi), se incluyen en algunas definiciones como subregiones del VTA (Ikemoto 2007; Oades and Halliday 1987; Sanchez-Catalan *et al*, 2014; Swanson 1982)(*ver Figura 2.5*). Tanto el PBP como el PN son zonas ricas en cuerpos

Antecedentes

neuronales DA, mientras que PFR y tVTA/RMTg presentan un contenido inferior en células DA, en concreto, esta última región está compuesta fundamentalmente por neuronas que liberan ácido γ -aminobutírico (GABA, **neuronas GABA**) (Ikemoto 2007; Jhou *et al*, 2009a; Perrotti *et al*, 2005).

El VTA recibe proyecciones desde múltiples regiones del cerebro que modulan la actividad de las neuronas, principalmente las DA, allí presentes (Geisler and Zahm 2005; Phillipson 1979; Yetnikoff *et al*, 2014) (*Figura 2.3*). Son especialmente relevantes las **aferecias excitatorias glutamatérgicas** procedentes de: PFC (Sesack and Pickel 1992), hipotálamo lateral (LH) (Rosin *et al*, 2003), núcleo del lecho de la estría terminal (Georges and Aston-Jones 2002), núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg) y núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) (Paxinos and Watson 2007; Semba and Fibiger 1992). También recibe **aferecias inhibitorias GABAérgicas** desde: pálido ventral (VP) (Geisler and Zahm 2005) y NAc (Conrad and Pfaff 1976). En este sentido, es importante destacar la influencia inhibitoria que reciben por parte de las neuronas GABA locales y las que proyectan desde el propio RMTg/tVTA (Johnson and North 1992a; Kaufling *et al*, 2009; Sanchez-Catalan *et al*, 2014).

Otras proyecciones relevantes para la funcionalidad del VTA son, las **noradrenérgicas** procedentes del locus coeruleus y las **serotoninérgicas** procedentes de los núcleos dorsales del rafe (Geisler and Zahm 2005; Phillipson 1979).

Por otra parte, las neuronas del VTA **envían proyecciones** a la totalidad de los territorios desde los que recibe aferecias con la única excepción, tal vez, del colículo superior. Pero, además, envían también proyecciones a

otras áreas, como por ejemplo el hipocampo, la corteza entorrinal y el área septal lateral (Beckstead *et al*, 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. Las proyecciones son también de naturaleza neuroquímica variable en función de la diana considerada (Fallon *et al*, 1984; Margolis *et al*, 2006b; Swanson 1982).

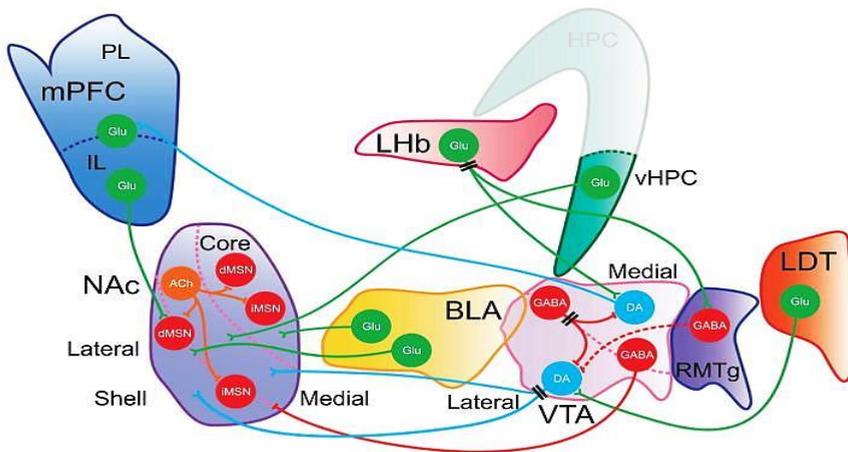


Figura 2.3. Principales elementos del sistema mesolímbico dopaminérgico caracterizado mediante optogenética. Aparecen representadas las principales aferencias y eferencias del VTA, especialmente los circuitos neuronales implicados en la recompensa (LDT-VTA-NAc) y aversión (Lhb-VTA-mPFC) (algunas proyecciones importantes como las procedentes de la mPFC no se ilustran en aras a la claridad del esquema). Las líneas de puntos representan los hallazgos no obtenidos mediante optogenética. La doble marca negra (=) representa la existencia de incertidumbre en la población neuronal de origen de la proyección. **Abreviaturas:** **ACh:** acetilcolina; **BLA:** amígdala basolateral; **DA:** dopamina; **dMSN:** vía directa neuronas espinosas medianas; **Glu:** glutamato; **HPC:** hipocampo; **iMSN:** vía indirecta neuronas espinosas medianas; **IL:** corteza infralímbica; **LDT:** núcleo tegmental laterodorsal; **Lhb:** habénula lateral; **mPFC:** corteza prefrontal medial; **MSN:** neuronas espinosas medianas; **NAc:** núcleo accumbens; **PL:** corteza prelímbica; **RMTg:** núcleo tegmental rostromedial; **vHPC:** hipocampo ventral; **VTA:** área tegmental ventral. Adaptado de Nieh *et al*, 2013.

Antecedentes

2.2.1.a. Heterogeneidad de las neuronas del VTA

El VTA ha sido considerado clásicamente como una región eminentemente dopaminérgica, estimándose que alrededor del **60-70 %** de su población neuronal (en la rata) son **neuronas DA**, aunque este porcentaje es bastante inferior al del área vecina, la *substantia nigra* (SN), donde aproximadamente el 90 % son DA (Margolis *et al*, 2006b; Nair-Roberts *et al*, 2008; Swanson 1982). De la población restante, aproximadamente el **30 %** se corresponde citoquímicamente con **neuronas GABA** (Carr and Sesack 2000; Margolis *et al*, 2006a; Van Bockstaele and Pickel 1995), aunque también se han identificado entre un **2-3 %** de neuronas que liberan glutamato (**neuronas Glu**) (Chuhma *et al*, 2004; Lavin *et al*, 2005). Además, ciertas subpoblaciones de neuronas coliberan dos neurotransmisores diferentes (Stuber *et al*, 2010; Sulzer *et al*, 1998). Es importante considerar que esta clasificación se ha ido modificando a lo largo de los años, conforme avanza el conocimiento sobre esta región y su población neuronal.

Clásicamente, las neuronas de esta área se han identificado mediante criterios **electrofisiológicos** y **farmacológicos**, considerándolas como poblaciones homogéneas y bien caracterizadas. En concreto, la identificación de las neuronas DA del VTA se ha basado en una actividad marcapasos de baja frecuencia, potenciales de acción amplios, hiperpolarización por DA a través de los receptores D₂, o la presencia de la llamada corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h), generada por canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN) (Kitai *et al*, 1999; Lammel *et al*, 2014). Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que estas características que permiten identificar de forma

fiable a las neuronas DA de la SN (“**neuronas DA convencionales**”) (Brown *et al*, 2009), no resulta del todo fiable para identificar a las neuronas DA del VTA. Curiosamente, en esta área se pueden encontrar numerosas excepciones (“**neuronas DA no-convencionales**”) a las "características" propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de las neuronas DA (Lammel *et al*, 2008; Margolis *et al*, 2006b; 2008; Nair-Roberts *et al*, 2008; Swanson 1982; Ungless and Grace 2012).

Estos estudios han mostrado que **las neuronas DA del VTA forman una población heterogénea, cuyas propiedades moleculares y electrofisiológicas son variables dependiendo del área al que proyectan** (Lammel *et al*, 2008; Margolis *et al*, 2008). Así, las neuronas denominadas “convencionales” se localizan en el VTA lateral y *substantia nigra pars compacta* (SNc), y proyectan al NAc shell lateral y estriado dorsal, respectivamente. Mientras que las “no-convencionales” se sitúan en la región posteromedial del VTA y proyectan a la corteza prefrontal medial (mPFC), NAc core, NAc shell medial y a la amígdala basolateral (BLA) (Lammel *et al*, 2008) (*Figura 2.4*).

Antecedentes

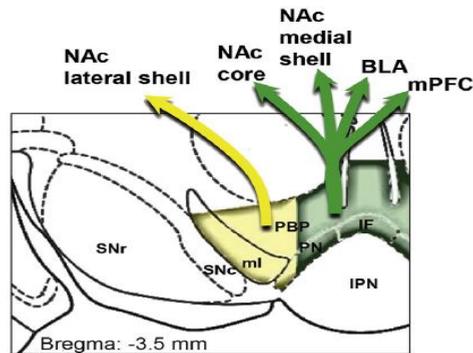


Figura 2.4. Representación esquemática de la localización en el VTA de parte de las neuronas DA convencionales (amarillo) y no-convencionales (verde), así como parte de las proyecciones de dichas neuronas. **Abreviaturas:** mPFC: corteza prefrontal medial; BLA: amígdala basolateral; NAc: núcleo accumbens; IF: núcleo interfascicular; PN: núcleo paranigral; PBP: área pigmentada parabraquial; ml: lemnisco medial; SNC: sustantia nigra pars compacta; SNr: sustantia nigra pars reticulata; IPN: núcleo interpeduncular. Adaptado de Lammel et al, 2014.

Además, estas subpoblaciones parecen exhibir **diferencias en su respuesta a las drogas**, como opioides (Ford et al, 2006; Margolis et al, 2008), nicotina (Ericson et al, 2008; Zhao-Shea et al, 2011), cocaína (Lammel et al, 2011) y también **etanol**. Concretamente, en este último caso, las neuronas DA situadas en la región más medial del VTA mostraban una mayor respuesta al etanol que las neuronas localizadas en la región más lateral de esta área, presentando mayores incrementos en su frecuencia de disparo. (Mrejeru et al, 2015).

Adicionalmente, también se han identificado diferentes subpoblaciones dentro de las neuronas GABA del VTA (Margolis et al, 2012).

2.2.1.b. Heterogeneidad antero-posterior del VTA

La heterogeneidad de las diferentes subpoblaciones neuronales, parece explicar la diferente funcionalidad, observada durante años, de la región anterior (VTAa) y posterior del VTA (Ikemoto 2010; Sanchez-Catalan *et al*, 2014). En ratas, el límite entre las regiones anterior y posterior del VTA se ha establecido alrededor de -5.5 mm desde bregma, que neuroanatómicamente corresponde a la posición del núcleo interpeduncular (IP), por debajo del VTA (Figura 2.5) (Olson *et al*, 2005).

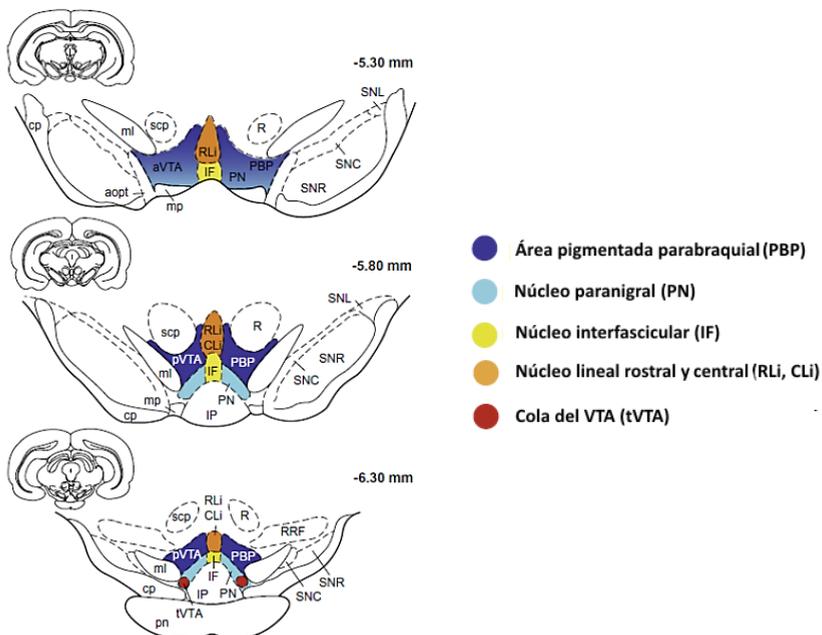


Figura 2.5. Esquema de la organización del VTA en la ratona. La distancia antero-posterior desde bregma se indica encima de cada plano. **Abreviaturas:** aopt: tracto óptico accesorio; aVTA: VTA anterior; cp: pedúnculo cerebral; IP: núcleo interpeduncular; ml: lemnisco medial; mp: pedúnculo mamilar; pn: núcleo pontino; PPTg: núcleo tegmental pedúnculo-pontino; pVTA: VTA posterior; R: núcleo rojo; RRF: campo retrorubral; scp: pedúnculo cerebeloso superior; SNC: substantia nigra pars compacta; SNL: substantia nigra lateral; SNR: substantia nigra pars reticulata; tVTA: cola del VTA; VTA: área tegmental ventral. Adaptado de Sanchez-Catalan *et al*, 2014.

Antecedentes

De entre todas las proyecciones que emanan del VTA, la **proyección dopaminérgica del VTA al estriado ventral** (tubérculo olfatorio lateral, NAc shell lateral y NAc core) ha sido la más estudiada. Las neuronas DA que envían eferencias hacia el estriado ventral se distribuyen en el VTA según una topografía, preferentemente, aunque no exclusivamente, posteromedio- anterolateral, que mantiene un ángulo aproximado de 45° con respecto a la línea media del cerebro (Haber *et al*, 2000; Ikemoto 2007; 2010).

En la *Figura 2.6* se ilustra la topografía de la proyección dopaminérgica del VTA al estriado ventral. El **estriado ventral lateral** (tubérculo olfatorio lateral, NAc shell lateral y NAc core) recibe su innervación dopaminérgica desde las porciones **anteriores (VTAa) y laterales del VTA** (tonalidades amarilla y verdes), mientras que el conjunto del **estriado ventral medial** (tubérculo olfatorio medial y NAc shell medial) recibe innervación dopaminérgica desde la zona **posterior (VTAp) y medial del VTA** (tonalidades roja y granate). Centrando la atención en las distintas estructuras del VTA, se puede apreciar que: (i) la zona medial del PBP y el PN proyectan selectivamente hacia la zona medial del estriado ventral y (ii) 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 IF y CL. Esta evidencia, 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.

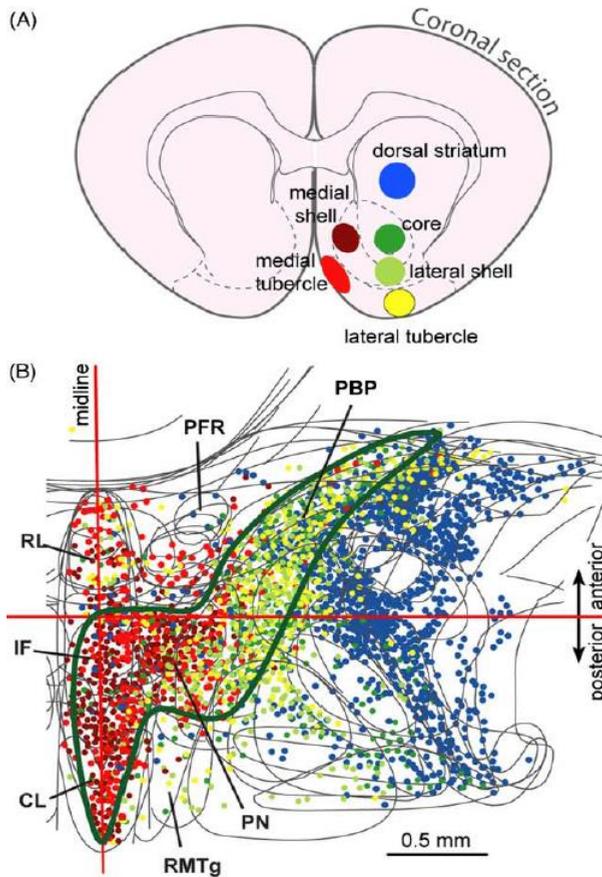


Figura 2.6. Topografía de las proyecciones dopaminérgicas desde el VTA al estriado ventral. **A.** Representa las áreas del estriado ventral y dorsal donde se inyectó el trazador retrógrado Flurogold. Los diferentes colores diferencian los sitios de inyección. **B.** Las neuronas marcadas retrógradamente se representan en secciones horizontales del mesencéfalo ventral. Cada uno de los puntos representa a una neurona marcada, para cada una de las áreas de inyección según el código de colores mostrado en A. La línea verde indica el área aproximada que proporciona la proyección dopaminérgica al estriado ventral. **Abreviaturas:** CL: núcleo lineal central; IF: núcleo interfascicular; PBP: área pigmentada parabraquial; PFR: área adyacente al fascículo retroflexo; PN: núcleo paranigral; RL: núcleo rostral lineal del rafe; RMTg: núcleo tegmental rostromedial. Adaptado de Ikemoto 2010.

Antecedentes

Esta heterogeneidad antero-posterior en la organización de las proyecciones dopaminérgicas, permitiría explicar las diferencias conductuales y fisiológicas observadas en los estudios con diferentes drogas, incluido el etanol y sus derivados (Sanchez-Catalan *et al*, 2014). Así, tanto el **etanol, como el ACD y el SAL, se autoadministran e inducen activación locomotora en VTAp, pero no en VTAA** (Ding *et al*, 2015; Hipolito *et al*, 2010; Rodd *et al*, 2008; Rodd-Henricks *et al*, 2000; 2002; Sanchez-Catalan *et al*, 2009). Estudios neuroquímicos y electrofisiológicos confirman esta heterogeneidad funcional. La administración de **etanol, en VTAp pero no en VTAA, produce un incremento en la liberación de DA en NAc shell** (Ding *et al*, 2009a; Melis *et al*, 2007). De forma similar, el etanol **activa a las neuronas DA del VTAp e inhibe a las del VTAA** (Guan *et al*, 2012; Melis *et al*, 2007; 2015). El **ACD y el SAL administrados en VTAp también activan a las neuronas DA y aumentan la liberación de DA en NAc shell** (Deehan *et al*, 2013b; Hipolito *et al*, 2011; Melis *et al*, 2007; Xie *et al*, 2012; Xie and Ye 2012).

Respuestas similares se han observado para sustancias como la nicotina, carbacol, opioides, cannabinoides y cocaína (Ikemoto and Wise 2002; Ikemoto *et al*, 2006; Sanchez-Catalan *et al*, 2014; Zangen *et al*, 2006).

Estas evidencias parecen indicar que es **el VTAp, y no el VTAA, el que está relacionado con los fenómenos de refuerzo.**

2.2.2. Modulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas por el etanol y sus derivados

2.2.2.a. Activación de las neuronas dopaminérgicas del VTA

Las drogas presentan una característica común: la **activación de las neuronas DA del VTA** con el consecuente incremento en la liberación de DA en las áreas de proyección (Gessa *et al*, 1985; Hyman *et al*, 2006; Nestler 2001).

En animales conscientes, la presentación de recompensas inesperadas o de estímulos predictores de estas recompensas, promueve el cambio en la actividad neuronal desde una modalidad tónica (que proporciona el tono dopaminérgico basal en las áreas de proyección) a la fásica en el 55-80 % de las neuronas del VTA (Grace and Bunney 1984a; 1984b; Overton and Clark 1997; Pan *et al*, 2005; Salamone 2007; Schultz 1998). Este cambio se postula como el responsable del incremento en los niveles de DA 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 and Wickens 1996; Mahon *et al*, 2004; Montague *et al*, 2004; Schultz 1998; Wickens *et al*, 2003; Wolf *et al*, 2004). Además, estos aumentos fásicos de DA 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 (Berridge 2007; Nicola 2007; Pankseep 1998). Es por ello que la **activación**

Antecedentes

motora se ha considerado como un **índice conductual que indica, con bastante precisión, la activación fásica de las neuronas DA del VTA** (Pankseep 1998).

Aunque los mecanismos involucrados en esta activación son conocidos con detalle para drogas como los psicoestimulantes, opiáceos o nicotina, no ocurre lo mismo con el etanol. Además, como hemos visto anteriormente, el ACD y SAL comparten esta característica con el etanol (ver **secciones 2.1.1.b y 2.1.2.b**).

Hoy en día, multitud de estudios han mostrado que el etanol es capaz de modular la actividad de las neuronas DA a través de su interacción con diferentes sistemas neuroquímicos y endocrinos del sistema nervioso central, como el GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, opioide, cannabinoide y el factor liberador de corticotropina, entre otros. Además, puede actuar sobre distintos canales iónicos (canales de calcio, potasio) y modular componentes citoplasmáticos, como segundos mensajeros (*Figura 2.7*) (Erdozain and Callado 2014; Morikawa and Morrisett 2010).

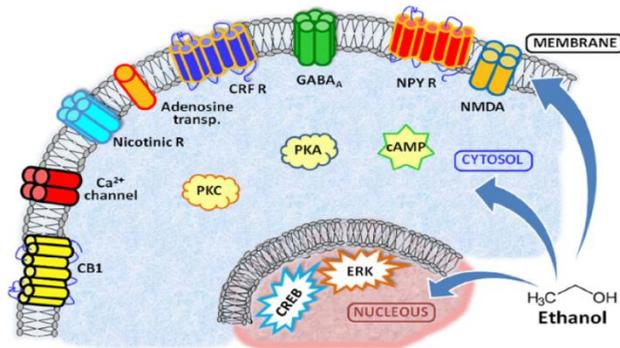


Figura 2.7. Representación de gran parte de los componentes celulares que se ven afectados tras la exposición directa o indirecta a etanol: receptores de membrana, elementos implicados en la señalización citosólica y factores de transcripción en el núcleo. Abreviaturas: R: receptor; CB1: receptor cannabinoide tipo 1; Ca²⁺ channel: canal de calcio; Nicotinic: nicotínico; Adenosine transp: transportador de adenosina; CRF: factor liberador de corticotropina; GABA_A: receptor de ácido γ-aminobutírico tipo A; NPY: neuropéptido Y; NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato; PKC y PKA: proteína quinasa C y A; cAMP: adenosín monofosfato cíclico; CREB: proteína de unión al cAMP; ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares. Adaptado de Erdozain and Callado 2014.

A pesar de haber identificado todas esas posibles interacciones, el mecanismo preciso por el cual el etanol produce la activación de las neuronas DA, no se conoce con certeza. Mientras algunos investigadores han apuntado a que el etanol podría activar directamente a las neuronas DA, otros autores han indicado que la activación de dichas neuronas se produciría de forma indirecta. Asimismo, tampoco se ha determinado con exactitud si es el etanol o si son sus metabolitos los responsables de la activación neuronal.

Antecedentes

- **Acción directa**

En lo que concierne a la **acción directa**, diferentes estudios han mostrado que el **etanol** es capaz de activar a las neuronas DA al actuar sobre los canales iónicos que modulan su actividad, especialmente, **incrementando la corriente I_h** (formada por iones de Na^+ y K^+) y **reduciendo las corrientes de potasio tipo A (I_A) y M (I_M)** (Brodie *et al*, 1990; Brodie and Appel 1998; Brodie *et al*, 1999a; 1999b; Koyama *et al*, 2007; Okamoto *et al*, 2006). Melis y colaboradores (Melis *et al*, 2007) mostraron que el **ACD** también puede activar a las neuronas DA mediante su acción sobre las corrientes I_h e I_A . Por otra parte, el etanol *in vitro*, es capaz de activar a las neuronas DA del VTA aisladas, es decir, en unas condiciones en las que, según los autores, la capacidad de síntesis de ACD es limitada (Brodie *et al*, 1999b; Ye *et al*, 2001). Además, la acción del ACD sobre la corriente I_M , no se ha determinado.

En conjunto, estos datos parecen indicar que el etanol y el ACD producen efectos electrofisiológicos diferentes sobre las neuronas DA. Sin embargo, como se ha ilustrado en secciones anteriores, diversos estudios han comprobado de forma convincente que, el etanol carece de efecto sobre dichas neuronas cuando se reducen los niveles de ACD (Diana *et al*, 2008; Foddai *et al*, 2004; Melis *et al*, 2007) o cuando este metabolito es inactivado (Enrico *et al*, 2009) (ver secciones **2.1.1.c** y **2.1.2.c**). Por tanto, la explicación más plausible sería que los derivados del etanol, ACD y SAL, son un componente esencial dentro de los efectos del etanol sobre las neuronas DA.

- **Acción indirecta**

Se ha sugerido que más que la acción directa descrita, debería existir otro mecanismo que provocara la activación de las neuronas por parte del etanol. Esta hipótesis está fundamentada en las diferencias que se aprecian entre los estudios electrofisiológicos *in vitro* e *in vivo*, como en la magnitud del efecto del etanol sobre las neuronas DA (que parece ser mayor *in vivo* (Gessa *et al*, 1985; Mereu and Gessa 1984; Stobbs *et al*, 2004) que *in vitro* (Brodie *et al*, 1990; Brodie and Appel 1998; Brodie *et al*, 1999b; Brodie and Appel 2000; Okamoto *et al*, 2006)), o la diferente sensibilidad al etanol entre las neuronas DA del VTA y la SNc que se manifiesta *in vivo* (Gessa *et al*, 1985) pero no *in vitro* (Okamoto *et al*, 2006). Así, se ha propuesto que el etanol puede ejercer una **acción indirecta a través de su interacción con los diferentes sistemas neurotransmisores** que constituyen las aferencias sobre las neuronas DA del VTA, fundamentalmente con los sistemas glutamatérgico y GABAérgico (Lovinger 1997; Morikawa and Morrisett 2010; Vengeliene *et al*, 2008), las principales aferencias excitatorias e inhibitorias sobre dichas neuronas.

A continuación, se expondrán algunas de las evidencias que revelan la existencia de otras dianas para la acción, tanto del etanol como de sus metabolitos (para un análisis más detallado ver Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013c; Erdozain and Callado 2014; Morikawa and Morrisett 2010).

Diferentes estudios han mostrado que el **etanol** puede activar a las neuronas DA al **incrementar, de manera indirecta, la liberación de glutamato (Glu)** sobre estas neuronas. El etanol, administrado

Antecedentes

sistémicamente o localmente en el cerebro, incrementa los niveles de DA en el VTA (Campbell *et al*, 1996; Kohl *et al*, 1998; Yan *et al*, 1996; 2005), la cual activa a los receptores de dopamina D₁ presinápticos (localizados en las terminales glutamatérgicas (Lu *et al*, 1997)) produciendo la liberación de Glu. La aplicación de un antagonista selectivo de los receptores D₁ (SKF 83566) o la depleción de los niveles de DA, reducen este efecto (Deng *et al*, 2009; Xiao *et al*, 2009). Adicionalmente, Xie y Ye (Xie and Ye 2012), han mostrado que el **SAL** es capaz de activar a las neuronas DA al aumentar, de forma indirecta a través de los receptores D₁, la transmisión glutamatérgica. En este caso, la aplicación del antagonista SKF 83566, también reduce este efecto. Además, dado que SAL es el producto de la condensación del ACD con la DA, la ausencia de formación del SAL cuando se produce la depleción de los niveles de DA, podría explicar porque el etanol no es capaz de incrementar la liberación de Glu en los estudios citados anteriormente (Deng *et al*, 2009; Xiao *et al*, 2009). De este modo, ambos compuestos parecen compartir el mismo mecanismo de acción, aunque el SAL ha mostrado ser mucho más potente que el etanol, ya que a menor concentración ejerce el mismo efecto. En cuanto al **ACD**, se ha visto que la inhibición del receptor D₁ (SCH 39166), previene la adquisición del CPP inducido por este metabolito (Spina *et al*, 2010), aunque en este caso, no se ha vinculado a una acción sobre la transmisión glutamatérgica, sino a una inhibición de la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Ibba *et al*, 2009; Spina *et al*, 2010; Vinci *et al*, 2010), las cuales se han relacionado con el mecanismo de acción de diferentes drogas (Girault *et al*, 2007; Valjent *et al*, 2004).

También se ha demostrado que el etanol y sus metabolitos, pueden excitar la actividad neuronal mediante su interacción con los **receptores de serotonina (5-HT)**. La administración localizada de **etanol** en el VTA induce la **liberación de 5-HT** y DA (Yan *et al*, 1996). La 5-HT liberada tras la administración de etanol, podría activar a los receptores 5-HT_{1B}, localizados en los terminales GABAérgicos, produciendo la desinhibición de las neuronas DA al **inhibir la liberación presináptica de GABA** (Johnson *et al*, 1992; Morikawa *et al*, 2000). De hecho, la administración localizada en VTA de un antagonista de los receptores 5-HT_{1B} (SB 216641), reduce la liberación de DA en VTA y NAc inducida por la administración sistémica de etanol (Yan *et al*, 2005). La activación de los receptores 5-HT_{2A} también parece inducir la excitación de las neuronas DA, al producir la **despolarización de la membrana** de dichas neuronas y **suprimir la hiperpolarización mediada por receptores glutamatérgicos metabotrópicos** (Paolucci *et al*, 2003; Pessia *et al*, 1994). El etanol podría ejercer parte de su acción a través de estos receptores, puesto que la coadministración intra-VTA de un antagonista de dichos receptores (R-96544) junto con etanol, es capaz de reducir la autoadministración de esta droga (Ding *et al*, 2009b). Además, aunque no se ha definido el mecanismo exacto, la activación del receptor 5-HT₃ induce la estimulación de las neuronas DA. Pero sí que se ha demostrado que la administración de un antagonista de los receptores 5-HT₃ (ICS 205-930) suprime la liberación de DA en el VTA, subsecuente a la administración sistémica de etanol (Campbell *et al*, 1996). Corroborando este hallazgo, se ha demostrado que la autoadministración intra-VTA de **etanol** y **SAL**, pero no de **ACD**, se ve extinguida por la coadministración de ese mismo antagonista de los receptores 5-HT₃ (ICS 205-930) (Rodd *et al*, 2005; 2008). De hecho, se

Antecedentes

ha demostrado que el SAL puede incrementar la liberación de 5-HT (Maruyama *et al*, 1992; 1993) y el ACD no parece tener afinidad por el receptor 5-HT₃ (Li 2000).

Por último, diferentes evidencias electrofisiológicas indican que la actividad de las neuronas GABA, tanto interneuronas como neuronas de proyección, es crucial para la regulación de la actividad de las neuronas DA del VTA (Haber *et al*, 2000; Johnson and North 1992b; Kalivas 1993; Sanchez-Catalan *et al*, 2014). El **etanol**, puede **inhibir a las neuronas GABA** (Gallegos *et al*, 1999; Steffensen *et al*, 2000; 2009; Stobbs *et al*, 2004) y en consecuencia, **desinhibir a las neuronas DA** (Johnson and North 1992a; Mereu and Gessa 1985; Xiao *et al*, 2007). Respecto al mecanismo por el cual el etanol induce la inhibición de las neuronas GABA, algunos autores han sugerido que podría deberse a la inhibición de la excitación de las neuronas GABA mediada por el receptor NMDA (Steffensen *et al*, 2000; Stobbs *et al*, 2004). Otros autores han mostrado que podría estar mediada a través de los receptores D₂ (Ludlow *et al*, 2009), GABA_A (Xiao *et al*, 2007; Xiao and Ye 2008) o GABA_B (Federici *et al*, 2009; Steffensen *et al*, 2000). En ninguno de estos estudios se analizó la implicación del ACD o SAL. Por el contrario, sí que existen diversos estudios que han analizado el papel del **sistema opioide endógeno** como posible diana del mecanismo de acción del etanol y sus metabolitos (Gianoulakis 2009; Nutt 2014; Oswald and Wand 2004; Samson and Doyle 1985; Volpicelli *et al*, 1992).

La actividad de las neuronas GABA está controlada de modo tónico por receptores opioides de tipo μ (MORs) presentes en el soma y en el área dendrítica de las mismas (Garzon and Pickel 2001; Mansour *et al*, 1995;

Steffensen *et al*, 2006). Johnson y North, en 1992 (Johnson and North 1992a), demostraron que los agonistas de los MORs disminuían la frecuencia de los potenciales espontáneos inhibitorios de las neuronas GABA del 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, diferentes laboratorios han corroborado estas observaciones. Por ejemplo, Xiao y colaboradores (Xiao *et al*, 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 MORs) hiperpolariza y silencia la excitación neuronal de las neuronas GABA del VTA (Steffensen *et al*, 2006; Xiao and Ye 2008), lo cual repercute en una desinhibición de las neuronas DA (Spanagel *et al*, 1992).

Diversos autores han mostrado mediante estudios electrofisiológicos que el etanol es capaz de modificar este sistema controlado por los MORs (Guan and Ye 2010; Xiao *et al*, 2007; Xiao and Ye 2008). Tanto *in vivo* como *in vitro*, el etanol es capaz de alterar la transmisión GABAérgica sobre las neuronas DA del VTA a través de un mecanismo que implica la participación de los MORs. Así, la administración de naloxona atenúa la inhibición inducida por el etanol sobre las neuronas GABA y la activación inducida sobre las neuronas DA, además, revierte el bloqueo inducido por el etanol sobre la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica mediada por los receptores GABA_A sobre las neuronas DA (Guan and Ye 2010; Xiao *et al*, 2007; Xiao and Ye 2008). Asimismo, estudios conductuales han mostrado que la administración de naltrexona (NTX) (un antagonista de los receptores opioides) o

Antecedentes

β -Funaltrexamina (β -FNA) (un antagonista selectivo e irreversible de los MORs), previenen la activación motora inducida por la administración intra-VTA tanto de **etanol**, como de **ACD** (Sanchez-Catalan *et al*, 2009). Pero, **¿cuál es el mecanismo de acción por el cual el etanol o sus derivados son capaces de inhibir a las neuronas GABA a través de los MORs?**

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** (Pastor *et al*, 2005; Sanchis-Segura *et al*, 2000; Sanchis-Segura and Aragon 2002; Xiao *et al*, 2007; Xiao and Ye 2008). Esta hipótesis está basada en el hecho de que el etanol y otras drogas son capaces de inducir la liberación de este péptido a nivel del NArc (Schulz *et al*, 1980; Zangen *et al*, 1999), NAc (Marinelli *et al*, 2004; Olive *et al*, 2001; Roth-Deri *et al*, 2003; Zangen *et al*, 1999), amígdala central (CeA) (Lam *et al*, 2008) y del mesencéfalo, incluyendo el VTA (Jarjour *et al*, 2009; Rasmussen *et al*, 1998), permitiendo que el péptido liberado active a los MORs presentes en estas regiones (Sanchis-Segura *et al*, 2005). De hecho, se ha demostrado que el etanol inyectado en el NArc promueve la activación motora en ratas, siendo dicho efecto prevenido tanto por la inhibición de la CAT como por la administración de NTX (Pastor and Aragon 2008). Por tanto, existen datos que apoyan la hipótesis de que el NArc y sus neuronas β -endorfinicas se requieren para la estimulación inducida por **etanol** y **ACD**. Sin embargo, no hay datos claros que expliquen cómo el etanol, o más específicamente el ACD, interactúan con las neuronas del NArc. 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 *et al*, 2002; Pastorcic *et al*, 1994; Reddy and Sarkar 1993; Reddy *et al*, 1995).

La explicación alternativa propuesta por algunos grupos de investigación, entre los cuales se encuentra el nuestro, postula que el **SAL**, generado localmente tras metabolizarse el etanol, se comportaría como un **agonista de los MORs** provocando la inhibición de las neuronas GABA, y en consecuencia, la desinhibición de las DA (Critcher *et al*, 1983; Hipolito *et al*, 2008; Matsuzawa *et al*, 2000; Myers *et al*, 1985; Xie *et al*, 2012). Esta idea se fundamenta en la demostración de que el SAL, que presenta una estructura similar a la morfina (Davis and Walsh 1970), es capaz de unirse a los receptores opioides y producir efectos similares a los de estos compuestos (Fertel *et al*, 1980; Lucchi *et al*, 1982). 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 ACD). Efectivamente, esto es lo que observaron Xie y colaboradores (Xie *et al*, 2012). Estos autores mostraron que el SAL deprime la transmisión GABAérgica sobre las neuronas DA, y que la administración de NTX previene esta inhibición. Asimismo, otros autores han comprobado que la administración de antagonistas de los receptores opioides previene tanto el CPP inducido por SAL (Hipolito *et al*, 2011; Matsuzawa *et al*, 2000), como la estimulación motora generada por la administración intra-VTA de SAL, ACD y etanol (Hipolito *et al*, 2010; Sanchez-Catalan *et al*, 2009), así como los incrementos concomitantes de los niveles de DA en NAc (Hipolito *et al*, 2011).

2.2.2.b. Depresión de las neuronas dopaminérgicas del VTA

Aunque la mayoría de estudios han mostrado que la administración de etanol induce la activación de las neuronas DA e inhibe a las neuronas GABA del VTA (Gallegos *et al*, 1999; Steffensen *et al*, 2000; 2009; Stobbs *et al*, 2004), determinados estudios han mostrado que en determinadas condiciones, se produce la situación contraria. Por ejemplo, Steffensen y colaboradores (Steffensen *et al*, 2009) comprobaron que la administración intravenosa de dosis bajas de **etanol** (0.01–0.03 g/kg) **fue capaz de activar** parte de las **neuronas GABA** examinadas. De forma similar, diferentes estudios *in vitro*, han demostrado que el etanol de forma dosis-dependiente, induce una activación de las neuronas GABA del VTA. Según estos estudios, esta acción inhibitoria del etanol se debe a un **incremento en la liberación presináptica de GABA sobre las neuronas DA** (Theile *et al*, 2008; 2009; 2011; Xiao and Ye 2008). De hecho, estos resultados son coherentes con diferentes evidencias experimentales que muestran que el etanol también potencia la liberación de GABA en otras áreas del cerebro, como BLA, hipocampo, SNr y CeA (Criswell *et al*, 2008; Siggins *et al*, 2005; Weiner and Valenzuela 2006).

Actualmente, el mecanismo de acción que subyace a esta inhibición no se conoce. Theile y colaboradores (Theile *et al*, 2009) han propuesto que la liberación de GABA es dependiente de los receptores 5-HT_{2C}, cuya activación induce la liberación de Ca²⁺ desde las vesículas sensibles a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃).

Tampoco se ha estudiado si esta inhibición puede tener consecuencias a nivel conductual, o si este efecto puede estar mediado por el ACD o el SAL.

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

El alcoholismo como una enfermedad crónica: El problema de las recaídas y su tratamiento

La adicción a drogas es una enfermedad crónica y recidivante de etiología multifactorial que incluye factores genéticos, neurobiológicos, psicológicos y ambientales (Jupp and Lawrence 2010; Koob and Le Moal 2006). A partir de los datos obtenidos del último estudio acerca del consumo de drogas en la población española (15 a 64 años), se desprende que es el consumo de alcohol es el de mayor prevalencia, experimentando un ligero aumento respecto al estudio anterior (*Figura 2.8*). Del total de los encuestados, el 4.9 % presenta un consumo problemático de alcohol, de los cuales el 4.5 % (1 600 000 personas) presenta un consumo de riesgo y el 0.4 % (120 000 personas) presenta una posible dependencia (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2015).

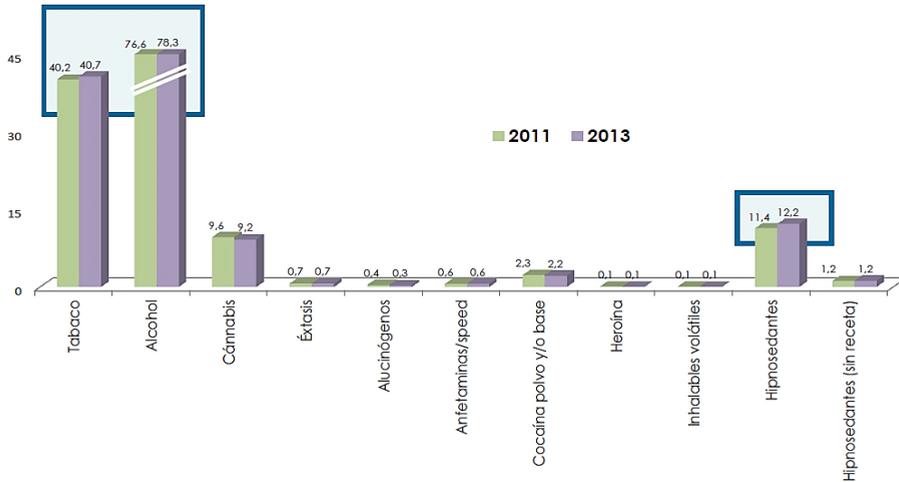


Figura 2.8. Proporción de consumidores (15-64 años) de drogas en España. Representación gráfica adaptada de la encuesta sobre alcohol y drogas en España realizado por el Plan Nacional sobre Drogas. (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2015).

Estudios a nivel mundial arrojan resultados parecidos. Según el último informe de la OMS, en 2010 el consumo de alcohol puro per cápita en todo el mundo fue de 6.2 litros entre la población de más de 15 años, lo cual implica una cifra diaria de 13.5 gramos de alcohol puro al día. En concreto, en Europa se registró un 25 % del consumo mundial de alcohol, siendo este el porcentaje de consumo más elevado (World Health Organization 2014 ed).

Además, el alcoholismo no es solo un problema sanitario en sí mismo, sino que también conlleva multitud de problemas asociados, tales como violencia o absentismo laboral, los cuales tienen un elevado coste económico y social para nuestra sociedad. El uso nocivo del alcohol se encuentra entre

Antecedentes

los cinco principales factores de riesgo de enfermedad, discapacidad y muerte en todo el mundo. De hecho, en 2012 se produjeron cerca de 3.3 millones de muertes a causa del consumo de alcohol, lo que supone el 5.9 % de todas las muertes a nivel mundial. Además de los fallecimientos, se estima que en ese mismo año, el 5.1 % de todas las enfermedades y lesiones que supusieron una merma importante en la calidad de vida (cerca de 139 millones de casos), fueron atribuibles al consumo de alcohol. En Europa, se registraron los mayores porcentajes de fallecimientos y de años de vida sana perdidos atribuibles al consumo del alcohol (Rehm *et al*, 2009; World Health Organization 2014 ed).

2.3. ALCOHOLISMO: El problema de las recaídas

El reconocimiento por parte de la mayoría de la clase médica de que el **alcoholismo es una enfermedad de naturaleza crónica**, supuso un paso crucial para aceptar que es necesario diseñar un abordaje terapéutico para el tratamiento del individuo alcohólico. La complejidad del problema, y el desconocimiento más o menos profundo de las alteraciones que se producen a nivel cerebral en los alcohólicos, ha limitado hasta la fecha el desarrollo de estrategias terapéuticas que sean realmente eficaces. Hay que tener en cuenta que el etanol y, en general, **las drogas, generan cambios no del todo conocidos en determinados sistemas del cerebro que perduran durante largo tiempo después de abandonar su uso**. La naturaleza duradera de estos cambios sitúa a los individuos adictos en un estado de elevado riesgo de recaída.

De acuerdo al glosario de términos proporcionado por la OMS, **la recaída puede ser definida como la reanudación de la ingesta de alcohol tras un período de abstinencia**. Algunos expertos diferencian entre recaída (*relapse*) y desliz (*lapse* o *slip*), esta última denota una ocasión aislada de consumo de alcohol o drogas dentro del periodo de abstinencia (World Health Organization 1994).

Actualmente, **el mayor problema a nivel clínico** con el que se enfrenta el equipo terapéutico **al tratar pacientes alcohol-dependientes ya desintoxicados, es la prevención de las recaídas durante los períodos de abstinencia**. Sin intervención terapéutica alguna, se estima que más de un

Antecedentes

70 % de los pacientes recaen en el consumo de alcohol en el plazo de un año (Johnson 2008). Esta situación es común a otras drogas, de hecho, algunos autores han estimado que el riesgo de recaída en el consumo de drogas es superior al 60 % en el primer año, especialmente durante los 6 primeros meses que siguen al abandono del consumo (McLellan *et al*, 2000). Así pues, la recaída es una parte fundamental del trastorno adictivo y debe considerarse prioritario el desarrollo de tratamientos preventivos de la misma.

En la actualidad, en el ámbito clínico existe un amplio consenso sobre la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos fármaco-terapéuticos para la prevención de las recaídas en el alcoholismo (Addolorato *et al*, 2012) que, junto con la psicoterapia, mejoren la tasa de éxito de los tratamientos actualmente disponibles (Bergmark 2008; Hillemacher *et al*, 2015; Kranzler and Van Kirk 2001; Spanagel 2009; Wackernah *et al*, 2014).

2.3.1. Modelos experimentales para el estudio de las recaídas

Es obvio que no es posible reproducir completamente en la investigación preclínica, mediante modelos animales, la complejidad de la condición humana. Sin embargo, a pesar de la complejidad intrínseca del alcoholismo, décadas de investigación apoyan la hipótesis de que los modelos animales, concretamente el modelo del alcoholismo en rata, constituyen una excelente plataforma para la selección y el desarrollo de tratamientos farmacológicos para este trastorno (Belin-Rauscent *et al*, 2015; Bell *et al*, 2012; Bossert *et al*, 2013; Ciccocioppo 2013; Vengeliene *et al*, 2014). Es importante destacar que estos modelos se han utilizado con éxito para ensayar medicamentos que están aprobados actualmente para el tratamiento del alcoholismo (Heyser *et al*, 2003; Holter *et al*, 1997; Walker and Koob 2008).

Respecto a las recaídas, existen dos grupos de modelos experimentales que permiten analizar la eficacia preventiva de los posibles candidatos farmacológicos.

2.3.1.a. Modelos de reanudación

Se trata de modelos de autoadministración operante en los que el animal debe aprender a realizar una determinada tarea, como manipular lo que se denomina un *operando* (por ejemplo, presionar una palanca), para la obtención de la droga (**fase de condicionamiento o aprendizaje**). En esta

Antecedentes

fase, la manipulación del operando además de estar asociada a la obtención de la droga está, en ocasiones, asociada a la presentación de un estímulo visual (por ejemplo, una luz) o sonoro (un determinado sonido de una frecuencia específica). Alcanzado un consumo estable, debido a una tasa de respuesta sobre el operando constante, se somete a los animales a una **fase de extinción**, en la cual la manipulación del operando deja de estar asociada a la obtención de la droga. Tras la extinción, el experimentador presenta a los animales diferentes situaciones o estímulos (pistas o estímulos ambientales, la administración de una pequeña dosis de alcohol ("*priming*") o situaciones que inducen estrés) que habían estado apareados a la droga durante la fase de condicionamiento y evalúa si se reinstaura o no la respuesta de manipulación del operando (**reanudación**), aun **sin la presencia de la droga**.

Existen muchos autores que consideran que los modelos de reanudación son un **buen indicador de la búsqueda de la droga y recaída en el consumo de alcohol** (Le and Shaham 2002; Rodd *et al*, 2004b; Spanagel 2003). Los fármacos antirecaída más utilizados actualmente, el acamprosato y la NTX, son capaces de suprimir la reanudación tras una fase de extinción (Bachteler *et al*, 2005; Katner *et al*, 1999), hecho que **valida predictivamente** a este tipo de modelos. Sin embargo, la recaída se define como una vuelta al consumo de la droga tras un periodo de abstinencia. Por tanto, este modelo **no resulta adecuado para el estudio de la recaída**, ya que no existe un periodo de abstinencia propiamente dicho (el animal sigue ejecutando las mismas tareas para conseguir la droga, aunque no lo consiga) y además, la fase de reanudación se produce sin que el animal vuelva a recibir la droga, por lo que

no se producen los efectos psicoactivos asociados con su ingesta (Conklin and Tiffany 2002; Sanchis-Segura and Spanagel 2006; Shaham *et al*, 2003). Por ello, este tipo de modelos no imita las características conductuales básicas del individuo alcohólico ni se caracteriza por el mismo perfil sintomático, **careciendo de validez de constructo, es decir, su semejanza con el comportamiento humano es limitada.**

2.3.1.b. Modelos en los que se evalúa el fenómeno ADE

En 1968, Sinclair y Senter mostraron como en ratas que habían tenido un acceso voluntario al etanol durante un período de tiempo prolongado, se producía **un incremento significativo y transitorio en la ingesta de la droga después de un período o periodos de abstinencia forzada.** Este fenómeno recibió la denominación de **ADE**, siglas de **“Alcohol Deprivation Effect”** (Sinclair and Senter 1968). Desde este estudio, el ADE ha sido descrito no solo en rata (Herz 1997; McKinzie *et al*, 2000; Rodd-Henricks *et al*, 2000; Sinclair and Li 1989; Spanagel and Holter 1999), sino también en ratón (Salimov and Salimova 1993), mono (Kornet *et al*, 1991) y en humanos (Burish *et al*, 1981). Además, se ha visto que este fenómeno se observa de igual manera tanto en condiciones de libre acceso, como en condiciones de acceso restringido, en modelos de autoadministración operante y en modelos de autoadministración no operante (Martin-Fardon and Weiss 2013). De forma que este modelo presenta **validez de constructo.**

Antecedentes

Algunos autores proponen esta alternativa para el estudio de los aspectos de la recaída que no pueden analizarse con los modelos de reanudación (Le and Shaham 2002). Así, el acamprosato y la NTX también son capaces de reducir/suprimir el ADE (Holter and Spanagel 1999; Sinclair and Sheaff 1973; Spanagel and Kiefer 2008). Esta validación farmacológica ha proporcionado **validez predictiva al modelo ADE** en lo referente a la búsqueda de nuevos y mejores fármacos en el tratamiento de las recaídas.

Es necesario tener en consideración que el modelo difiere en determinados aspectos de la situación habitual en humanos. Por ejemplo, se ha criticado que, en estos modelos que miden el ADE, el periodo de abstinencia no está bajo el control del animal. Además, el modelo solo sirve para caracterizar la vuelta al consumo de alcohol como consecuencia de la re-exposición a la droga y, por tanto, la motivación que, en humanos, antecede a la búsqueda de la droga no se puede analizar mediante este modelo.

A pesar de esto, en los últimos años este modelo se ha convertido en un paradigma ampliamente utilizado para el estudio de la eficacia de nuevos fármacos que potencialmente podrían utilizarse en el tratamiento de las recaídas en el consumo de alcohol. Estos estudios, ponen en evidencia que los procesos que subyacen al fenómeno de la recaída parecen incluir los mismos circuitos neuronales en roedores que en humanos, constituyendo los modelos animales una excelente base para el desarrollo de nuevas farmacoterapias (Spanagel and Kiefer 2008; Spanagel 2009; Vengeliene *et al*, 2008). Por tanto, los resultados alcanzados en los estudios preclínicos que

Antecedentes

emplean la medición del ADE, proporcionan una base sólida para el desarrollo posterior de ensayos clínicos controlados.

2.4. ARSENAL TERAPÉUTICO EXISTENTE

A día de hoy, los tratamientos farmacológicos disponibles para reducir el riesgo de recaída en la ingesta de alcohol son bastante escasos. A continuación, se expondrá sucintamente, las bases farmacológicas y los datos relativos a la eficacia clínica de los fármacos aprobados por las distintas autoridades sanitarias para el tratamiento del alcoholismo (para una revisión reciente ver, Franck and Jayaram-Lindstrom 2013; Soyka and Lieb 2015; Spanagel and Vengeliene 2013; Wackernah *et al*, 2014; Zindel and Kranzler 2014).

- **Fármacos aversivos**

El arsenal disponible inicialmente, quedaba restringido a los fármacos que actúan como **inhibidores de la enzima ALDH, disulfiram y cianamida** (Antabus® y Colme®), produciendo **efectos aversivos** tras la ingesta de alcohol (enrojecimiento de la piel, ritmo cardíaco acelerado, confusión mental, etc.). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, los fármacos aversivos **no son muy eficaces para el tratamiento de las recaídas**, ya que los pacientes rápidamente aprenden que los graves efectos secundarios padecidos al consumir alcohol pueden desaparecer si abandonan el tratamiento. Su eficacia aumenta en pacientes muy motivados a mantener la abstinencia.

- **Acamprosato**

El **acamprosato** (N-acetil homotaurinato de calcio, Campral®), actúa como un **modulador de la transmisión glutamatérgica**, atenuando el estado “hiperglutamatérgico” que subyace a la abstinencia, tanto en la fase aguda como en la fase crónica (Bachteler *et al*, 2005; Spanagel *et al*, 2005). Aunque su mecanismo de acción no es del todo conocido, su actividad parece ser debida a la combinación de su acción como antagonista débil de los receptores ionotrópicos NMDA del Glu, junto a su acción como inhibidor del receptor metabotrópico tipo 5 del Glu (Blednov and Harris 2008; Cano-Cebrian *et al*, 2003; Kiefer and Mann 2010; Mann *et al*, 2008; Zornoza *et al*, 2003).

Los estudios **preclínicos** en modelos animales, han demostrado que el acamprosato es capaz de **reducir la autoadministración** de etanol (Spanagel 2003), **reducir** de forma selectiva **la búsqueda de la droga** en un modelo de reanudación (Bachteler *et al*, 2005) y también es capaz de **suprimir el fenómeno ADE** (Heyser *et al*, 1998; 2003; Sanchis-Segura and Spanagel 2006). Sin embargo, los datos de diferentes meta-análisis indican que su **eficacia clínica** puede ser considerada como **moderada o baja** (Berglund *et al*, 1997; Kranzler and Van Kirk 2001; Mann *et al*, 2013; Plosker 2015; Soyka 2013). A modo de ejemplo, en un meta-análisis donde se incluyeron cerca de 7 000 pacientes, los datos mostraron que el acamprosato es capaz de reducir la tasa de recaída en el consumo de alcohol en aproximadamente un 14 % en relación al placebo e incrementar el periodo de abstinencia en alrededor de un 11 %. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la reducción del consumo excesivo de alcohol ni en los biomarcadores

Antecedentes

hepáticos de consumo (GGT). Los propios autores sugieren que, aunque la eficacia del tratamiento es moderada, se deben de valorar estos resultados como positivos debido a la actual falta de tratamientos antirecaída (Rosner *et al*, 2010).

Por último, se debe considerar un estudio reciente, y hasta la fecha el único, que sugiere que el responsable de la actividad del acamprosato podría no ser su principio activo, el N-acetil homotaurinato, sino el calcio que se incluye en su formulación. Así, la formulación del N-acetil homotaurinato como sal de sodio, no redujo la autoadministración de etanol, ni la búsqueda de la droga en un modelo de reanudación y no fue capaz de suprimir el fenómeno ADE. Sin embargo, la administración de calcio en forma de diferentes sales, sí resultó efectiva en estos modelos animales (Spanagel *et al*, 2014).

- **Antagonistas opioides: Naltrexona y Nalmefeno**

Diversos estudios preclínicos han demostrado que la **NTX**, un **antagonista de amplio espectro de los receptores opioides** (O'Malley *et al*, 1992; Volpicelli *et al*, 1992), produce una **reducción del consumo voluntario de etanol** en ratas (Altshuler *et al*, 1980) y es capaz de **reducir la reanudación inducida por la reexposición al alcohol** (Bienkowski *et al*, 1999; Le *et al*, 1999; Liu and Weiss 2002), aunque ha resultado **ineficaz para bloquear la reanudación inducida por situaciones estresantes** (Le *et al*, 1999; Liu and Weiss 2002). Los **estudios que evaluaron el fenómeno ADE fueron**, sin embargo, **menos consistentes**, mostrando que la NTX es capaz de

atenuar el ADE, aunque su administración continuada podía producir un aumento en el consumo de etanol (Heyser *et al*, 2003; Holter and Spanagel 1999; Sinclair 2001).

Desde su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994, se han realizado múltiples análisis clínicos y meta-análisis que demuestran **efectos moderados, aunque significativos, de la NTX en cuanto a la prevención de la recaída en el consumo de alcohol en los pacientes alcohol-dependientes** (Roozen *et al*, 2006; Soyka and Rosner 2008; Srisurapanont and Jarusuraisin 2005a; 2005b). Según la última actualización de la revisión Cochrane en la que se analizaron datos correspondientes a 50 estudios que incluían un total de 7 793 participantes, Rösner y colaboradores (Rosner *et al*, 2010) mostraron que la NTX reduce de forma significativa el riesgo de consumo excesivo de alcohol (en un 17 % respecto al medido en el grupo placebo) y reduce un 4 % el número de días de consumo de alcohol (número de días, expresados como porcentaje, en los que el paciente consumió alcohol respecto a todos los días que duró el estudio), un efecto que no puede considerarse significativo. Como estos autores concluyen, debido al escaso arsenal terapéutico actualmente disponible en este ámbito, la NTX puede considerarse como **una terapia de efectividad moderada, pero útil**.

Sin embargo, algunos estudios clínicos han mostrado resultados variables en su respuesta clínica. Esta **heterogeneidad de la respuesta clínica de la NTX** parece ser debida a que su efectividad **depende del nivel de ingesta de alcohol antes del tratamiento**, obteniéndose mayor eficacia en aquellos pacientes con un consumo de alcohol alto o muy alto (Srisurapanont and Jarusuraisin 2005a; 2005b), y a la existencia de una **variante funcional en el**

Antecedentes

gen OPRM1, que codifica el MOR. Según diferentes estudios clínicos, la eficacia terapéutica de la NTX podría estar restringida a aquellos pacientes que presentan esta variante genética en el MOR (Anton *et al*, 2008; Oslin *et al*, 2003; Ray and Hutchison 2007).

Por último, a principios de 2013, la EMA autorizó la venta y comercialización del **nalmefeno** (Selincro®), un **antagonista de los receptores opioides de tipo μ y δ y agonista parcial de los receptores κ** , cuyo fin es la **reducción del consumo de alcohol en pacientes alcohólicos con un nivel de consumo catalogado de alto riesgo** (consumo superior a 60 g en varones o 40 g en mujeres de alcohol al día), que no tengan síntomas físicos de abstinencia y que no requieran una desintoxicación inmediata (Bart *et al*, 2005; Gual *et al*, 2013; Luquiens *et al*, 2011).

Los estudios preclínicos en ratas alcohol-dependientes demuestran que el nalmefeno es significativamente **más eficaz en la supresión de la ingesta de alcohol que la NTX** (Walker and Koob 2008). Por su parte, los estudios clínicos han mostrado que el nalmefeno **reduce el número de bebidas por día de consumo** en pacientes alcohol-dependientes (Mason *et al*, 1994), sin embargo, los datos referentes a los días de abstinencia, número de días de consumo excesivo, tiempo para recaer y deseo por consumir (*craving*) son controvertidos (Anton *et al*, 2004; Drobles *et al*, 2004; Karhuvaara *et al*, 2007; Mason *et al*, 1994; Mason *et al*, 1999).

2.5. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIRECAÍDA

Atendiendo a los datos mostrados anteriormente, podemos concluir que la eficacia de los tratamientos actualmente disponibles para las recaídas en el alcoholismo puede considerarse moderada o incluso baja (Edwards *et al*, 2011; Heilig *et al*, 2011; Leggio *et al*, 2010). Por ello, se hace necesario el desarrollo de **nuevos tratamientos farmacológicos para la deshabitación alcohólica** que supongan una clara mejoría frente a los actualmente disponibles (Addolorato *et al*, 2012).

La realización de **estudios preclínicos reproducibles y potentes** asegura un grado de éxito en los estudios clínicos y permite reducir costes económicos y de esfuerzo personal (Skolnick and Volkow 2012). En este sentido, recientemente se ha expuesto la problemática referente a la reproducibilidad de los datos obtenidos en la investigación preclínica (Steckler 2015), lo que está retrasando el desarrollo de nuevos fármacos e incluso ha llevado a varias organizaciones a tomar medidas con el fin de mejorar la reproducibilidad de datos (Mobley *et al*, 2013; Nature Editorial 2013). Actualmente, no hay duda de que con el fin de incrementar la potencia de traslación de la investigación preclínica, es importante **obtener datos en tantos paradigmas y modelos animales como sea posible** (Bell *et al*, 2012). En este contexto, se desarrollan parte de los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral.

2.5.1. Estrategias terapéuticas en evaluación para el tratamiento de la recaída

En las últimas décadas, fruto de la necesidad clínica y de la mejor comprensión de las bases neurobiológicas de la adicción al alcohol, se han identificado multitud de compuestos en la investigación básica que actualmente se están ensayando como fármacos potenciales para el tratamiento de las recaídas. Muchos de los compuestos (*Tabla 2.1*), actúan a nivel de receptores específicos de los neurotransmisores que, según las investigaciones previamente realizadas, participan de un modo u otro en distintos procesos relacionados con el alcoholismo (Hillemacher *et al*, 2015; Litten *et al*, 2012; Soyka and Lieb 2015; Wackernah *et al*, 2014). Desafortunadamente, el uso de la mayoría de los candidatos más prometedores se ha visto comprometido debido a problemas asociados con sus efectos secundarios (Leggio *et al*, 2010; Spanagel and Vengeliene 2013). Cabe añadir que, para este tipo de compuestos (agonistas GABA_B, antagonistas y agonistas parciales dopaminérgicos, varios anticonvulsivantes, antagonistas de los receptores NMDA y varios agentes serotoninérgicos), la evidencia clínica que existe es muy limitada o no hay diferencias respecto al placebo (European Medicine Agency (EMA) 2010).

RECEPTOR DIANA	COMPUESTO REPRESENTATIVO	ESTADO
5-HT ₃	Ondansetrón*	Preclínicos, Clínicos
5-HT ₂	Olanzapina*	Preclínicos, Clínicos
Adenosina A2A	DMPX	Preclínicos
Adrenérgico α ₁	Prazosín*	Preclínicos, Clínicos
AMPA/GABA _A	Topiramato*	Preclínicos, Clínicos
CRF1	Antalarmina, MTIP, Pexacerfont, GSK561679	Preclínicos, Clínicos
GABA _A	RY 023	Preclínicos
GABA _B	Baclofeno, CGP7930, GS39783, BHF177*	Preclínicos, Clínicos
GLT 1	Ceftriaxona*	Preclínicos
mGlu	MTEP	Preclínicos
nACh	Vareniclina*, CP-601932	Preclínicos, Clínicos
NK1	LY686017, Aprepitant*	Preclínicos, Clínicos
NMDA	Neramexane, Memantina*	Preclínicos, Clínicos
NOP	OS-462, UFP-102, UFP-112	Preclínicos
NPS	NCG-0018568403	Preclínicos
NPY1, NPY2	BIIE0246, JNJ-31020028	Preclínicos
Opioides	Nalmefeno, Naltrexona*	Preclínicos, Clínicos
DOR	SoRI-9409, TAN-67	Preclínicos
KOR	Nor-BNI	Preclínicos
OX1, OX2	SB-334867, JNJ-10397049	Preclínicos
P2X4	Ivermectina*	Preclínicos
Vasopresina 1b	Nelivaptan (SSR 149415)	Preclínicos

Tabla 2.1. Receptores que se ha demostrado que participan en distintos procesos relacionados con el alcoholismo y compuestos capaces de interaccionar con ellos. *Compuestos aprobados por la FDA para otras patologías. **5-HT**: 5-Hidroxitriptamina; **AMPA**: α-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato; **GABA**: ácido γ-aminobutírico; **CRF**: factor liberador de corticotropina; **GLT1**: transportador de glutamato 1; **mGlu**: receptor metabotrópico de glutamato; **nACh**: receptor nicotínico de acetilcolina; **NK**: neurocinina; **NMDA**: N-metil-D-aspartato; **NOP**: receptor opioide tipo 1; **NPS**: neuropéptido S; **NPY**: neuropéptido Y; **DOR**: receptor opioide δ; **KOR**: receptor opioide κ; **OX**: receptor de orexina; **P2X4**: receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando. Adaptado de Litten et al, 2012.

Antecedentes

Actualmente, una estrategia muy prometedora y alternativa al manejo de antagonistas o agonistas específicos de ciertos receptores para el tratamiento de la adicción a algunas drogas (cocaína, nicotina), es el empleo de **vacunas especialmente diseñadas contra estas drogas** (Shen *et al*, 2012). Su objetivo es generar anticuerpos específicos que, en presencia de la droga en el torrente circulatorio, se unirían a ella y permitirían reducir la velocidad y la cantidad de droga que accede al cerebro y, consecuentemente, dificultarían la unión de la misma a su receptor específico. Teóricamente, no interaccionarían directamente con ningún sistema de neurotransmisión, evitando los efectos secundarios derivados de esta acción (Shen *et al*, 2012). Desafortunadamente, esta nueva estrategia no se ha dirigido hacia el desarrollo de vacunas para el alcoholismo, probablemente por las propiedades fisicoquímicas tan particulares que presenta esta droga.

2.5.2. La inactivación del acetaldehído como una estrategia de tratamiento

Una alternativa que permitiría soslayar los problemas anteriormente citados, podría ser la **inactivación química de la droga antes de que ésta pueda interactuar con su receptor/es**. Si como se ha expuesto previamente, el **ACD** es necesario para la activación del sistema MCLD, el **bloqueo de su formación** (empleando inhibidores metabólicos adecuados) o su **inactivación química** (empleando agentes secuestrantes) podrían convertirse en estrategias terapéuticas antirecaída eficaces al evitar el efecto “priming” en eventuales episodios de nuevo contacto con la droga. El **efecto “priming”** es un incremento en la motivación para consumir una determinada droga que se produce cuando un paciente en abstinencia consume una única dosis (a veces muy pequeña, en relación a la que habitualmente consumía) de esa sustancia. Los pacientes abstinentes refieren con claridad que si durante la abstinencia consumen una pequeña dosis de su droga preferida, el deseo por volver a consumir e, incluso, la probabilidad de retomar el consumo regular, aumentan (De Wit 1996; Ludwig and Wikler 1974; Stewart 2000).

Es importante remarcar que **el uso de inhibidores de la producción de ACD** (como los inhibidores de la CAT, ampliamente estudiados por el grupo del Dr. Carlos Aragón) como una nueva forma de intervención terapéutica, **parece no ser viable** debido a los más que previsibles efectos secundarios de estos compuestos, que desaconsejarían su uso a largo plazo en clínica.

Antecedentes

En opinión de algunos autores, **la alternativa más posibilista** como nueva forma de intervención terapéutica, sería la que haría uso de los **agentes secuestrantes del ACD**, en especial de los aminoácidos azufrados DP y L-cys. Tal y como se ha mostrado en el **apartado 2.1.1.c**, estos agentes secuestrantes son capaces de prevenir diferentes conductas evocadas por el etanol así como reducir el consumo de esta sustancia, lo que sugiere que **podría ser una estrategia útil para el tratamiento de las recaídas en el alcohol**. Por ejemplo, como se muestra en la *Figura 2.9*, nuestro grupo ha demostrado que la DP, administrada tanto de forma subcutánea (*Figura 2.9A*) como intra-VTAp (*Figura 2.9B*), es capaz de reducir de forma significativa el consumo de alcohol durante el periodo de post-abstinencia con respecto a su consumo basal, lo cual es indicativo de la **prevención del fenómeno ADE**. Además, la combinación de DP con NTX, previene la aparición del ADE demorado que se manifiesta tras el tratamiento con este último fármaco y que constituye la principal limitación de los tratamientos con antagonistas opioides en los modelos preclínicos (*Figura 2.9C*) (Orrico *et al*, 2013; 2014a).

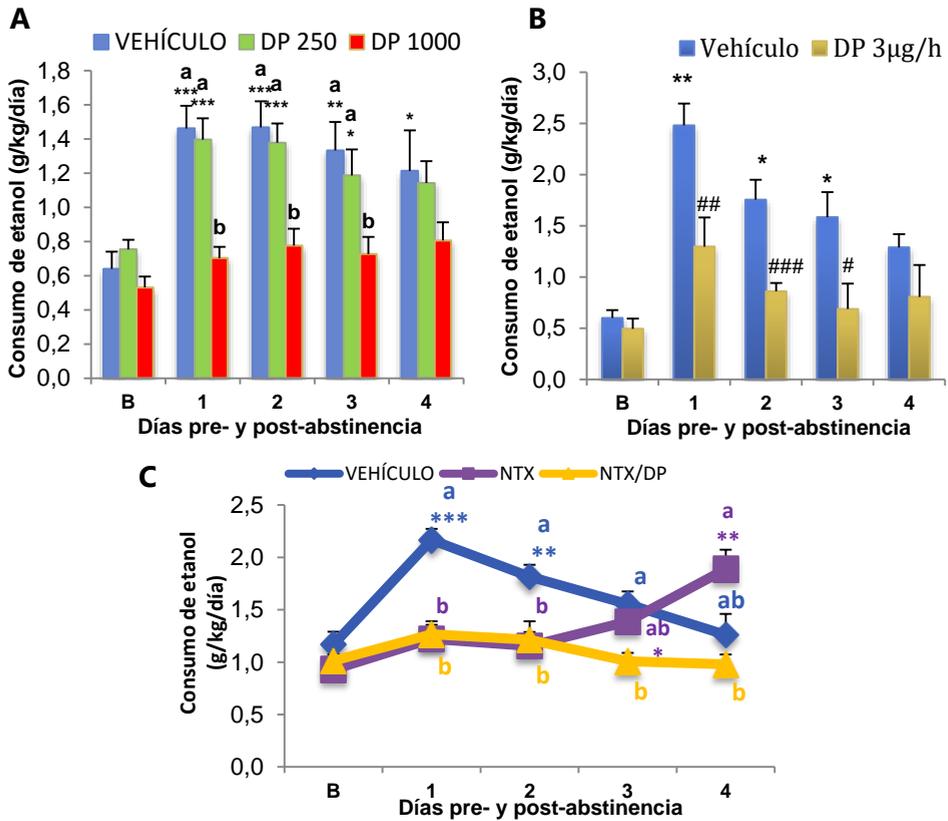


Figura 2.9. Consumo de etanol (g/kg/día) de los animales sujetos al modelo ADE tras la administración de D-penicilamina y/o Naltrexona. Los datos se presentan como media \pm EE. "B" representa el consumo basal de etanol y se corresponde con la ingesta media en los 3 días pre-abstinencia. **A:** Representa el consumo de etanol tras la **administración continua por vía subcutánea de vehículo (n=8), DP 250 μ g/h (n=9) o DP 1000 μ g/h (n=8)**. Las diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas en el consumo de etanol entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental ($p < 0.05$). **B:** Representa el consumo de etanol tras la **administración bilateral continua en el VTA de vehículo (n=6) o DP 3 μ g/h (n=6)**. Las almohadillas indican la existencia de diferencias significativas en los valores de consumo de etanol entre los grupos ensayados para cada día post-abstinencia ($\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$, $\#\#\#p < 0.001$). **C:** Representa el consumo de etanol tras la **administración de vehículo (n=7), la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas (n=7), o la inyección subcutánea de NTX 5 mg/kg cada 12 horas junto con una perfusión subcutánea de 250 μ g/h de DP (n=7)**. Las diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas entre los diferentes grupos ensayados para cada tiempo experimental ($p < 0.05$). En todos los casos, los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los correspondientes consumos basales de etanol ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). En ningún caso el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los valores de consumo basal de etanol medidos en los grupos ensayados.

Antecedentes

Teniendo en cuenta estos precedentes y considerando las recomendaciones expuestas en cuanto a la mejora de los datos preclínicos, en la presente Tesis se reevaluará la eficacia preclínica de la DP para prevenir la recaída alcohólica en un paradigma experimental diferente al utilizado en estudios previos de nuestro grupo de investigación, en los cuales se emplearon procedimientos de autoadministración no operante.

3. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente memoria ha sido explorar los efectos neuroconductuales del etanol en el sistema MCLD, ahondando en la posibilidad de que el etanol ejerza, de forma simultánea, efectos excitatorios y depresores sobre la actividad de las neuronas DA del VTA como consecuencia de la acción paralela de sus derivados (ACD y SAL) y la fracción no metabolizada del etanol, respectivamente. Una vez analizada la relevancia de los productos derivados del metabolismo del etanol en sus efectos neuroconductuales, este trabajo prosigue con la validación preclínica de una nueva estrategia terapéutica para la prevención de las recaídas en el consumo de alcohol basada en el secuestro del ACD, concretamente con el empleo de la DP.

Se diseñaron diferentes experimentos que permitieron abordar los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Análisis de la implicación de los derivados del etanol, generados localmente en el VTA, en los efectos estimulantes motores del etanol en ratas.
- II. Estudio del posible papel de la fracción no metabolizada del etanol sobre los efectos depresores de la actividad locomotora derivados de la administración de etanol en el VTA.
- III. Evaluación de la participación de los MORs en los efectos excitatorios del etanol.

Objetivos

- IV.** Exploración de la implicación de los receptores GABA_A en los efectos depresores del etanol.

- V.** Validación de la estrategia terapéutica basada en el secuestro del ACD mediante la DP en la prevención de la recaída en el consumo de alcohol. La efectividad de esta intervención se evaluará a través de la medida del fenómeno ADE en el modelo de autoadministración operante.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

*Efectos neuroconductuales del etanol en el sistema
mesocorticolímbico dopaminérgico*

4.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DEL ETANOL ADMINISTRADO EN VTA: PAPEL DEL ACETALDEHÍDO Y DE LA FRACCIÓN NO METABOLIZADA DEL ETANOL

El estudio del mecanismo de acción del etanol en el sistema MCLD se ha abordado desde distintas perspectivas y mediante diversas metodologías. En este trabajo, dicho estudio se ha enfocado mediante el análisis de la actividad motora exploratoria en ratas evocada por el etanol tras su administración localizada en el VTAp, conducta que se considera un reflejo de la actividad de las neuronas DA presentes en esta región cerebral (Ikemoto 2010; Pankseep 1998; Wise 2002). Con el fin de alcanzar los objetivos previamente expuestos, se diseñaron los siguientes experimentos:

- I. **Experimento 1:** Efectos del **secuestro del acetaldehído** sobre la activación motora derivada de la administración intra-VTAp de etanol.

- II. **Experimento 2, 3 y 4:** Estudio de los efectos **del acetaldehído y la fracción no metabolizada del etanol** en la actividad de las neuronas dopaminérgicas: Evaluación mediante la conducta motora de la rata.

Materiales y métodos

- III. **Experimento 5:** Análisis de la **implicación de los receptores opioides de tipo μ** en la activación motora derivada de la administración de etanol.

- IV. **Experimento 6:** Estudio de la **participación de los receptores GABA_A** en la inhibición de la conducta exploratoria tras la administración de etanol.

4.1.1. Animales de experimentación

El animal de experimentación empleado en todos los experimentos ha sido la **rata albina macho de raza Wistar**. Los animales (300-340 g en el momento de la cirugía) inicialmente se estabularon en cajas de polipropileno (48 x 38 x 21 cm³) en grupos de cuatro. Tras la cirugía y durante la realización de los experimentos, las ratas se estabularon de manera individual en cajas rectangulares de polipropileno (47 x 22 x 15 cm³) situadas de forma contigua para evitar, en la medida de lo posible, el estrés asociado al aislamiento.

Los animales utilizados se han criado en el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat de València, situado en la Facultat de Farmàcia, y se han mantenido con acceso libre a una dieta sólida estándar y agua, en perfectas condiciones higiénicas y climáticas: temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 % de humedad y ciclos de luz y oscuridad 12-12 horas (conexión de 8:00 a 20:00 h). Todos los procedimientos de trabajo han sido revisados y aprobados por el Comité Ético de la Universitat de València y se han realizado cumpliendo con todas las normas vigentes sobre experimentación animal (Directiva 2010/63/UE, transpuesta en España a través del RD 53/2013).

4.1.2. Solución de trabajo y sustancias químicas ensayados

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Fluido cerebroespinal artificial (aCSF)

Las microinyecciones *in vivo* en el VTAp se realizaron empleando como vehículo una solución de aCSF de pH 6.5. La composición de la misma fue: NaCl 120 mM, KCl 4.8 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂·6 H₂O 1.2 mM, NaHCO₃ 25 Mm, CaCl₂ 2.5 mM, D-glucosa 10 mM y ascorbato 0.2 mM.

SUSTANCIAS QUÍMICAS

El **etanol** (100% v/v sin indicador), suministrado por Scharlau (Madrid, Spain), para su **administración intra-VTAp** se diluyó convenientemente en aCSF en el momento de su empleo, con el fin de obtener las dosis a ensayar.

La **D-Penicilamina (DP)**, un agente secuestrante del ACD, se adquirió de Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). Su estructura química se muestra en la *Figura 4.1*. Para su **administración i.p.**, se disolvió convenientemente en suero salino fisiológico (salino) con el fin de conseguir la dosis deseada.

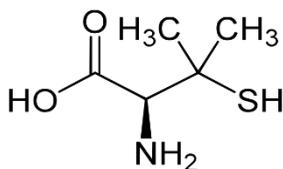


Figura 4.1. Estructura química de la D-Penicilamina.

Agonistas y antagonistas

El **DAMGO** ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin), un agonista selectivo de los MORs y la **Bicuculina (BIC)** (1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methbromide), un antagonista de los receptores GABA_A, fueron suministrados por Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). **β-Funaltrexamina (β-FNA)**(((E)-4-[[5α,6β]-17-Cyclopropylmethyl]-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenoiacid methyl ester hydrochloride), antagonista irreversible específico de los MORs, se adquirió de Tocris (Bristol, UK). Sus estructuras químicas se muestran en la *Figura 4.2*. Dichos compuestos se disolvieron en agua destilada a la concentración deseada y se congelaron alícuotas de dicha disolución a -20°C. Para su **administración intra-VTA**, se descongelaron las alícuotas necesarias y se diluyeron convenientemente en aCSF (DAMGO y BIC) o agua destilada (β-FNA).

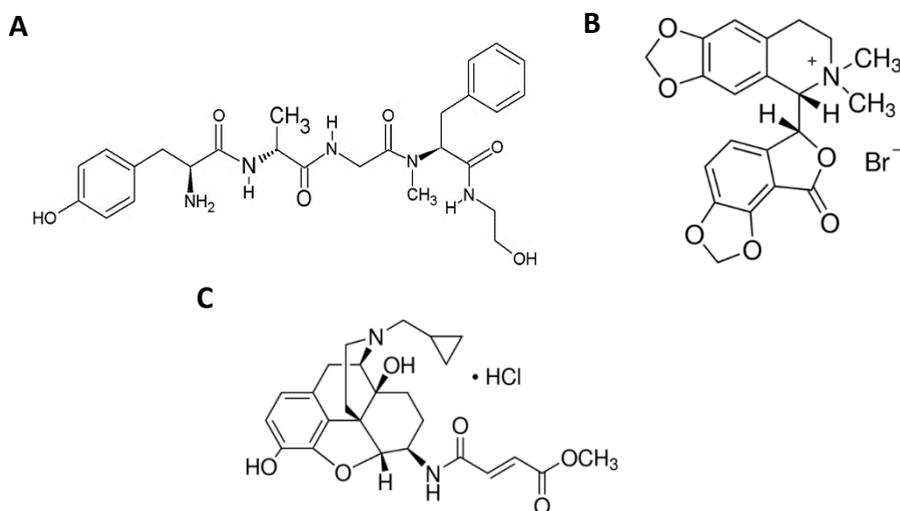


Figura 4.2. Estructura química del DAMGO (A), Bicuculina (B) y β-Funaltrexamina (C).

Materiales y métodos

Inhibidores

La **Azida sódica (AZ)**, una sal utilizada en diversos estudios como inhibidor de la enzima CAT, fue suministrada por Panreac (Spain). La **Cianamida (CI)**, un inhibidor de la ALDH, fue proporcionada por Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). Sus estructuras químicas se muestran en la *Figura 4.3*. Estos compuestos se disolvieron en salino en el momento de su empleo para su **administración i.p.**



Figura 4.3. Estructura química de la Azida sódica (A) y Cianamida (B).

4.1.3. Procedimientos experimentales

Cirugía estereotáxica y post-cirugía

A todos los animales empleados, se les implantó unilateralmente una cánula guía en el VTAp para facilitar la administración de las sustancias a ensayar mediante microinyección.

La operación se inició con la anestesia del animal mediante inyección i.p. de una solución que contenía una mezcla de ketamina (95 mg/kg)/xilacina (10 mg/kg) en salino estéril. Tras la anestesia, se rasuró la parte superior de la cabeza y se posicionó al animal en un equipo estereotáxico (Stoelting®). Posteriormente, se desinfectó la parte superior de la cabeza, se practicó una incisión longitudinal (8 - 10 mm) y los bordes de la incisión se impregnaron con un gel anestésico de lidocaína al 3 %. De este modo, quedó a la vista el cráneo del animal, permitiendo la visualización de los puntos bregma y lambda (*Figura 4.4*) que sirvieron de referencia para posicionar la cánula correctamente, de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas obtenidas a partir del Atlas de Paxinos y Watson (Paxinos and 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 28 G (Plastics One, USA) (*Figura 4.5A*). Las coordenadas fueron seleccionadas de tal modo que la cánula guía quedara posicionada, tras su implantación, 1 mm por encima del VTAp.

Materiales y métodos

Las coordenadas relativas a bregma y a la superficie del cráneo fueron las siguientes:

Antero/Posterior : - 6.0 mm

Lateral : ± 1.9 mm

Dorso/Ventral : -7.8 mm

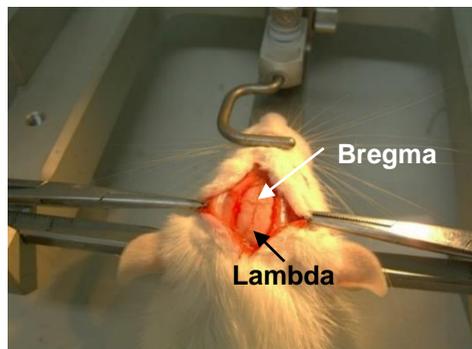


Figura 4.4. Imagen de los puntos de referencia Bregma y Lambda en el cráneo de la rata.

La cánula se introdujo con un ángulo de $\pm 10^\circ$ respecto a la vertical (Paxinos and Watson 2007). Dicha cánula se fijó a la superficie del cráneo con cemento dental “Rapid Repair” (Dentsplay®). Finalmente, tras el endurecimiento del cemento dental, se procedió a desinfectar la herida con povidona yodada al 10 % y se suturó con hilo de seda. La cánula fue mantenida ocluida desde su implantación hasta la realización de las

inyecciones, con la ayuda de un tapón especial de 33 G (Plastics One, USA) (*Figura 4.5B*) en el que el vástago sobresalía 1 mm distalmente al extremo de la cánula.

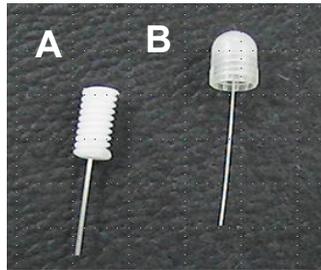


Figura 4.5. Cánula guía de 28 G (A) y tapón de 33 G (B).

Tras la cirugía, los animales se estabularon individualmente en cajas de polipropileno rectangulares con libre acceso a comida y agua, al menos durante 7 días.

Transcurridos 3 días desde la cirugía, los animales se sometieron, durante 5 minutos diarios, a un proceso de manipulación (*handling*) y de simulación de la microinyección (retirando e insertando el tapón en la cánula guía) en la habitación de experimentación. Durante esta fase, los animales se acostumbraron al experimentador, a la habitación donde se habían de realizar los experimentos, y al procedimiento de administración intra-VTAp. Se realizaron un total de entre 4 y 7 sesiones de manipulación antes del experimento con objeto de disminuir los inevitables efectos estimulantes debidos a la novedad y al propio proceso de administración.

Materiales y métodos

Procedimiento de microinyección

Las microinyecciones de las diferentes soluciones se realizaron en la habitación experimental con ayuda de un inyector metálico de 33 G (Plastics One, USA), cuyo extremo distal sobresalía 1 mm del final de la cánula guía (*Figura 4.6*). Los inyectores se conectaron mediante un tubo de polietileno PE-10, a una jeringa Hamilton de 25 μ l. 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, para las que la bomba se programó para inyectar un volumen de 300 nl a 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 4.6. Inyector de 33 G.

Análisis de la actividad motora

Para la realización del ensayo de actividad motora, en los experimentos en los cuales no se realizó ninguna administración i.p. (experimentos 2 y 6A), los animales se trasladaron desde la colonia a la habitación experimental, iluminada con una luz blanca tenue. Cuando los animales recibieron algún pretratamiento por vía i.p. (experimentos 1, 3, 4 y 6B), las inyecciones se realizaron en un espacio diferente al de la habitación experimental y, a continuación, se trasladaron a dicha habitación. En todos los casos, los animales permanecieron en la habitación experimental entre 20-30 minutos antes de realizar la microinyección en VTAp de acuerdo con el protocolo descrito en el epígrafe anterior. En el caso del experimento 5, el procedimiento de microinyección se realizó el día del pretratamiento y a las 24 h (sesión experimental).

Las cajas empleadas para el ensayo de actividad locomotora fueron las propias cajas de estabulación (47 x 22 x 15 cm³). Tras la microinyección se grabó el comportamiento del animal, mediante una cámara de vídeo digital, durante un periodo de 20 minutos. El parámetro evaluado en todos los experimentos fue la distancia recorrida, expresada en centímetros (cm), por los animales durante el tiempo de grabación. Su medición se realizó con la ayuda del programa Raddot (Universitat de València).

4.1.4. Planteamiento y diseño experimental

Dentro de este bloque experimental (4.1), a los grupos experimentales denominados 0, en el caso de la vía i.p. se les administró salino (2ml/300g) y en la vía intra-VTAp se les microinyectó aCSF (200 nl) (Experimentos 1A, 1B y 6A).

Experimento 1: Efectos del secuestro del acetaldehído sobre la activación motora derivada de la administración intra-VTAp de etanol

Si los efectos estimulantes del etanol sobre la actividad motora de los animales dependen del ACD generado tras metabolizarse localmente la droga en el VTAp, el secuestro del ACD, formado *in situ*, debería suprimir la activación motora derivada de la administración de etanol.

Para comprobar esta hipótesis se emplearon 96 animales (n=8/grupo), distribuidos aleatoriamente en dos experimentos: 1A (64 animales) y 1B (32 animales).

Experimento 1A: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp de etanol

En primer lugar, se evaluó si la administración sistémica de DP es capaz de atenuar o suprimir los efectos estimulantes locomotores evocados por la administración intra-VTAp de etanol. Para ello, se administró a los animales 0, 12.5, 25 y 50 mg/kg de este agente secuestrante por vía i.p. 30 minutos antes (Pretratamiento i.p.) de la microinyección intra-VTAp de aCSF o etanol (150 nmoles) (Tratamiento intra-VTAp), tal y como se describió en el epígrafe anterior (4.1.3). Las dosis y el protocolo temporal (*Figura 4.7*) fueron seleccionadas de acuerdo con estudios publicados previamente (Font *et al*, 2005). Así, los grupos experimentales fueron los siguientes:

Pretratamiento i.p.	Tratamiento intra-VTAp
DP 0	aCSF
	EtOH 150
DP 12.5	aCSF
	EtOH 150
DP 25	aCSF
	EtOH 150
DP 50	aCSF
	EtOH 150

Tabla 4.1. Grupos en el experimento 1A.

Materiales y métodos

El protocolo temporal empleado se muestra a continuación:



Figura 4.7. Esquema del protocolo temporal seguido en los experimentos 1A, 1B y 4.

Experimento 1B: Efecto de la administración sistémica de 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. de DP (50 mg/kg) sobre los efectos estimulantes locomotores producidos por la microinyección de DAMGO (0.013 nmoles) en VTAp. La dosis se seleccionó en base a la literatura existente (Hirose *et al*, 2005; Latimer *et al*, 1987). El protocolo experimental y la secuencia temporal empleados fueron los mismos que en el experimento 1A (*Figura 4.7*). Los grupos experimentales se presentan en la siguiente tabla:

Pretratamiento i.p.	Tratamiento intra-VTAp
DP 0	aCSF
	DAMGO
DP 50	aCSF
	DAMGO

Tabla 4.2. Grupos en el experimento 1B.

Materiales y métodos

Experimentos 2, 3 y 4: Estudio de los efectos del acetaldehído y la fracción no metabolizada del etanol en la actividad de las neuronas dopaminérgicas: Evaluación mediante la conducta motora de la rata

Este conjunto de experimentos se diseñó tras observar en el experimento 1A que, la administración de dosis elevadas de DP en conjunción con etanol (150 nmoles) conducía a una actividad motora ligeramente inferior a la observada en los animales control (grupo DP 0). Aunque, como se detallará en el capítulo de resultados, esta tendencia no fue estadísticamente significativa, sí sugería un posible efecto depresor del etanol sobre la actividad motora en presencia de elevados niveles del agente secuestrante. De acuerdo con la literatura, **la hipótesis de trabajo que se planteó fue que el etanol era capaz de simultáneamente i) reducir, mediante un mecanismo dependiente del ACD y la formación de SAL, y ii) aumentar, a través de un mecanismo no totalmente identificado y dependiente de la fracción no metabolizada del etanol, la liberación de GABA sobre las neuronas DA del VTA. El resultado neto producido sobre la conducta dependerá del balance entre ambos mecanismos, en función de la dosis de etanol ensayada.**

Con el fin de validar la hipótesis establecida, se plantearon una serie de experimentos que emplearon diferentes estrategias farmacológicas con el objetivo de analizar, por separado, los efectos excitatorios e inhibitorios del etanol sobre las neuronas DA.

Experimento 2: Selección de la dosis de etanol a administrar

Dentro de este bloque de experimentos, el primer paso consistió en la **búsqueda de la dosis de etanol** más alta que, en nuestras condiciones experimentales, careciera de efectos significativos sobre la actividad motora de los animales. Basándonos en datos previos (Sanchez-Catalan *et al*, 2009) y en resultados procedentes de ensayos preliminares, se evaluó la capacidad de la dosis de etanol de 35 nmoles para alterar la actividad motora de los animales tras su administración intra-VTAp. Para este experimento se emplearon 10 animales, distribuidos aleatoriamente en dos grupos (n=4/grupo aCSF y n=6/grupo EtOH 35), según la siguiente tabla:

Tratamiento intra-VTAp
aCSF
EtOH 35

Tabla 4.3. Grupos en el experimento 2.

Materiales y métodos

El protocolo temporal fue el siguiente:

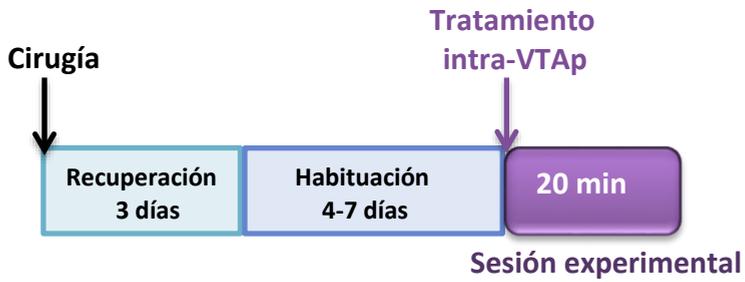


Figura 4.8. Esquema del protocolo temporal seguido en los experimentos 2 y 6A.

En base a los resultados satisfactorios obtenidos en este experimento, se decidió utilizar la dosis de **35 nmoles de etanol** como dosis de trabajo en los sucesivos estudios de este bloque experimental (4.1).

Experimento 3: Estrategia farmacológica diseñada para incrementar los niveles de acetaldehído en VTAp

De acuerdo a lo planteado en la hipótesis de trabajo, tras administrar una dosis de etanol para la cual ambos mecanismos de acción estuvieran compensados, el **incremento de los niveles de ACD y por tanto en la formación de SAL**, supondría una alteración de este balance. Si la activación de las neuronas DA del VTAp es dependiente de un mecanismo en el que está implicado el primer metabolito del etanol, tras administrar una dosis de etanol inicialmente neutra (35 nmoles en nuestro caso) sobre la conducta motora, el aumento del ACD resultaría en una **mayor activación neuronal y se debería observar como resultado un incremento de la actividad motora**.

En el presente experimento, para incrementar los niveles de ACD se utilizó la **CI**, un **potente inhibidor de la ALDH** (enzima responsable de la oxidación del ACD a acetato) (Koppaka *et al*, 2012). Este tratamiento ha sido previamente empleado por distintos grupos para modular la actividad de esta enzima en roedores (Escarabajal and Aragon 2002b; Sanchis-Segura *et al*, 1999a; Tambour *et al*, 2007). Experimentos previos han demostrado que la administración de etanol tras el pretratamiento con este inhibidor, produce un incremento significativo de los niveles de ACD tanto en sangre como en dializados cerebrales (Jamal *et al*, 2003a; 2003d; 2007). En base a la literatura existente, se ensayó la administración de 10 mg/kg i.p. de CI, 60 minutos antes de la microinyección de etanol (35 nmoles) o aCSF. 24 animales se distribuyeron de forma aleatoria entre 4 grupos experimentales (n=6/grupo).

Materiales y métodos

Los grupos experimentales (*Tabla 4.4*) y el protocolo experimental (*Figura 4.9*) se muestran a continuación:

Pretratamiento i.p.	Tratamiento intra-VTAp
Salino	aCSF
	EtOH 35
Cl 10	aCSF
	EtOH 35

Tabla 4.4. Grupos en el experimento 3.

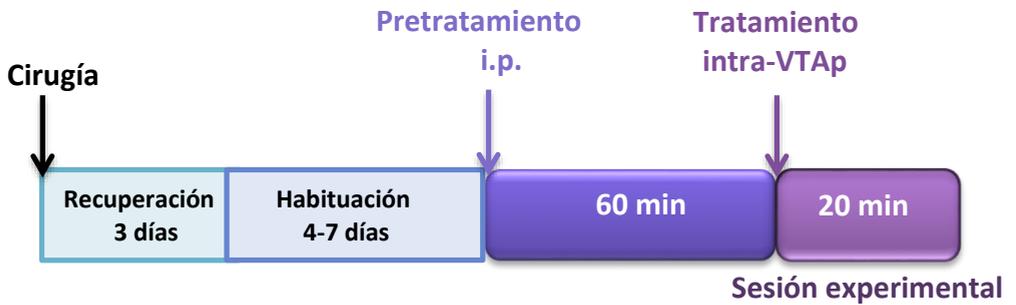


Figura 4.9. Protocolo experimental seguido en el experimento 3.

Experimento 4: Estrategias farmacológicas diseñadas para reducir los niveles de acetaldehído en VTAp

De forma opuesta a lo planteado en el experimento 3, si tras administrar una dosis de etanol inactiva desde el punto de vista motor, **se reducen los niveles de ACD presentes en el VTA y la formación de SAL, la acción predominante debería ser la desencadenada por la fracción no metabolizada del etanol. Es decir, las estrategias farmacológicas encaminadas a reducir los niveles de ACD deberían desequilibrar la balanza de los efectos a favor de los procesos promotores de la liberación de GABA sobre las neuronas DA** y, por tanto, debería prevalecer la inhibición de estas neuronas como efecto final. Consecuentemente, desde el punto de vista conductual debería observarse una **reducción en la locomoción** de los animales.

Para evaluar esta hipótesis se plantearon dos estrategias diferentes: la inactivación del ACD formado mediante su secuestro con DP (4A) y la inhibición de la CAT, principal enzima implicada en el metabolismo cerebral del etanol (4B).

Materiales y métodos

- **Experimento 4A: Efecto de la administración intra-VTAp de una dosis baja de etanol sobre la actividad motora de animales pretratados con D-Penicilamina**

Partiendo de los resultados obtenidos en el experimento 1A, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para **optimizar el secuestro de ACD**. Para ello, se analizó la actividad motora de las ratas tras la inyección intra-VTAp de **35 nmoles de etanol** (una dosis, aproximadamente 4.3 veces inferior a la utilizada en el experimento 1A) en animales pretratados con **DP 50 mg/kg i.p.** (la mayor dosis ensayada) 30 minutos antes. Se utilizaron 28 animales asignados aleatoriamente a uno de los 4 grupos experimentales (n=7/grupo) que se muestran en la siguiente tabla:

Pretratamiento i.p.	Tratamiento intra-VTAp
Salino	aCSF
	EtOH 35
DP 50	aCSF
	EtOH 35

Tabla 4.5. Grupos en el experimento 4A.

El esquema del protocolo experimental puede visualizarse en la *Figura 4.7* (experimento 1A).

- **Experimento 4B: Efecto de la administración intra-VTAp de una dosis baja de etanol sobre la actividad motora de animales pretratados con azida sódica**

Estudios previos han demostrado que la **inhibición de la CAT** es una estrategia útil para evitar tanto la activación de las neuronas DA del VTA *in vitro* (Melis *et al*, 2007), como la activación motora inducida tras la administración en SNc de etanol (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006). En este experimento se utilizó la **AZ**, cuya capacidad como inhibidor de esta enzima se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios *in vitro* (DeMaster *et al*, 1985; Gill *et al*, 1992; Zimatkin and Lindros 1996; Zimatkin *et al*, 2006). Siguiendo protocolos publicados con anterioridad (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006), evaluamos la actividad motora de los animales tras la administración i.p. de 7 mg/kg de AZ, 30 minutos antes de la microinyección intra-VTAp de 35 nmoles de etanol (el protocolo temporal puede visualizarse en la *Figura 4.7*, experimento 1A). Un total de 32 animales, distribuidos aleatoriamente en 4 grupos, se emplearon en este experimento (n=8/grupo) según se muestra en la siguiente tabla:

Pretratamiento i.p.	Tratamiento intra-VTAp
Salino	aCSF
	EtOH 35
AZ 7	aCSF
	EtOH 35

Tabla 4.6. Grupos en el experimento 4B.

Materiales y métodos

Experimento 5: Análisis de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación motora derivada de la administración de etanol

Si los productos derivados del metabolismo del etanol, el **ACD** y en último lugar el **SAL**, son los **responsables de la desinhibición de las neuronas DA del VTA al activar los MORs** localizados en las neuronas GABA del VTA, el **bloqueo de estos receptores debería disminuir o suprimir los efectos excitatorios del etanol sin afectar a los inhibitorios**, mediados por la fracción no metabolizada. Para comprobarlo, evaluamos la actividad motora de los animales tratados con 35 nmoles de etanol, pretratados 24 h antes con el antagonista selectivo de los MORs, **β -FNA**. En base a estudios previos (Hipolito *et al*, 2010; Hipolito *et al*, 2011; Sanchez-Catalan *et al*, 2009), se seleccionó la dosis de 2.5 nmoles del antagonista. 32 animales se distribuyeron aleatoriamente en uno de los 4 grupos experimentales que se muestran en la siguiente tabla (n=8/grupo):

Pretratamiento intra-VTAμ	Tratamiento intra-VTAμ
aCSF	aCSF
	EtOH 35
β -FNA 2.5	aCSF
	EtOH 35

Tabla 4.7. Grupos en el experimento 5.

Para este experimento se diseñó el siguiente protocolo temporal:

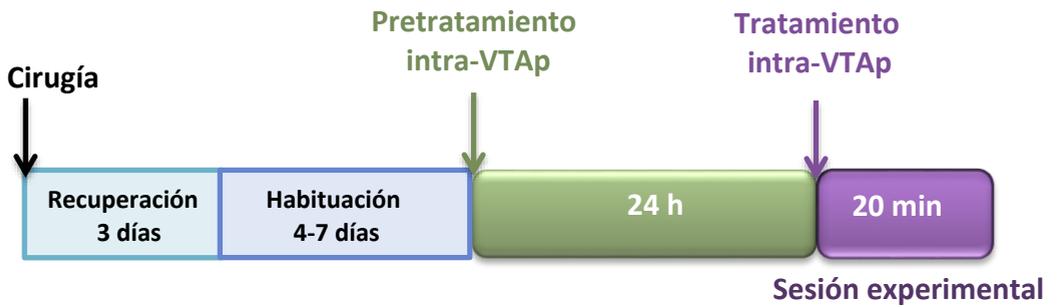


Figura 4.10. Protocolo experimental seguido en el experimento 5.

Materiales y métodos

Experimento 6: Estudio de la participación de los receptores GABA_A en la inhibición de la conducta exploratoria tras la administración de etanol

Estudios de electrofisiología sugieren que el etanol, a través de los receptores GABA_A, es capaz de incrementar la liberación de GABA sobre las neuronas DA del VTA reduciendo su actividad (Theile *et al*, 2008; 2009; 2011). Según nuestra hipótesis, la depresión motora observada tras la administración de etanol (experimento 4) podría ser debida a la acción de la fracción no metabolizada del etanol sobre los receptores GABA_A. Para evaluar esta idea se diseñaron dos experimentos:

Experimento 6A: Estudio de la administración intra-VTA_p de bicuculina sobre la actividad motora: Selección de dosis

El objetivo del presente experimento fue **seleccionar la dosis más alta del antagonista de los receptores GABA_A BIC** que, tras su administración **intra-VTA_p, no modificara la actividad basal de los animales**. Con este fin, 35 animales se distribuyeron aleatoriamente en uno de los 5 grupos experimentales (n=7/grupo) y recibieron 0, 8.75, 17.5, 35 o 70 pmoles de BIC en VTA_p (Tabla 4.8). Las dosis fueron seleccionadas en base a estudios previos (Arnt and Scheel-Kruger 1979; Ikemoto 2007).

El esquema del protocolo experimental puede visualizarse en la *Figura 4.8* (experimento 2).

Tratamiento intra-VTA _p
0
BIC 8.75
BIC 17.5
BIC 35
BIC 70

Tabla 4.8. Grupos en el experimento 6A.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la dosis de **17.5 pmoles** para la realización del siguiente experimento.

Materiales y métodos

Experimento 6B: Efectos del bloqueo de los receptores GABA_A en la actividad motora, tras la administración de una dosis baja de etanol en diferentes condiciones experimentales

De ser correcta nuestra hipótesis, **el bloqueo de estos receptores: (i) debería incrementar la actividad motora** en los animales administrados directamente en VTA con una dosis inactiva de etanol (35 nmoles, en nuestro caso), **en ausencia de intervención sobre los niveles de ACD, y (ii) debería prevenir la depresión motora originada por la fracción no metabolizada del etanol cuando farmacológicamente se han reducido los niveles de ACD.** 64 animales se asignaron aleatoriamente a cada uno de los 8 grupos experimentales (n=8/grupo) (*Tabla 4.9*) y recibieron dos pretratamientos diferentes antes del tratamiento intra-VTAp con aCSF o EtOH 35 nmoles. El pretratamiento 1 consistió en una administración i.p. de DP (50 mg/kg) o salino, 30 minutos antes del tratamiento. En el pretratamiento 2 recibieron una administración intra-VTAp de BIC (17.5 pmoles) o aCSF, 5 minutos antes del tratamiento (*Figura 4.11*).

Pretratamiento 1 i.p.	Pretratamiento 2 intra-VTA _p	Tratamiento intra-VTA _p
Salino	aCSF	aCSF
		EtOH 35
	BIC 17.5	aCSF
		EtOH 35
DP 50	aCSF	aCSF
		EtOH 35
	BIC 17.5	aCSF
		EtOH 35

Tabla 4.9. Grupos en el experimento 6B.

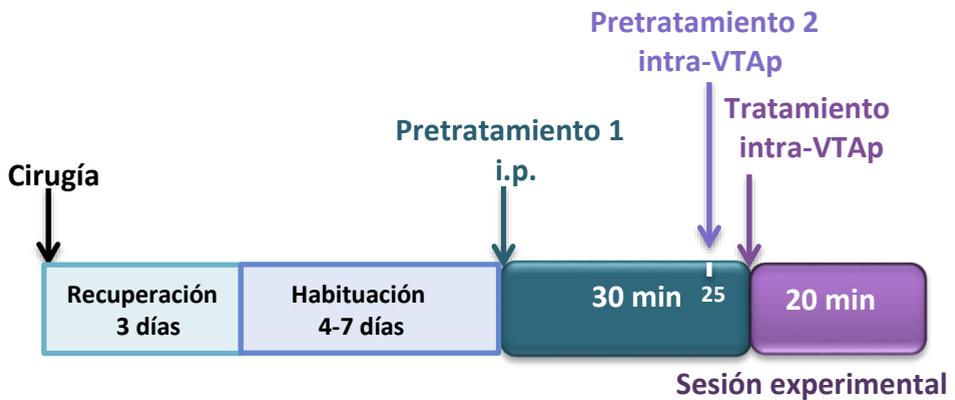


Figura 4.11. Protocolo experimental seguido en el experimento 6B.

4.1.5. Validación histológica

Una vez finalizados los experimentos, se procedió a la confirmación de la posición de la cánula de todos los animales empleados en los diferentes experimentos mediante evaluación histológica. Los animales se sacrificaron mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico. Tras el sacrificio, 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 con la ayuda de 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, se procedió a la validación histológica de la posición de la cánula implantada a través de microscopía óptica y según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007). Los criterios de aceptación empleados para considerar que la cánula está alojada en el VTAp han sido los descritos por Ikemoto (Ikemoto 2007). Las coordenadas, referidas todas ellas al punto bregma, fueron:

Antero/Posterior : desde -5.28 hasta -6.84 mm

Lateral : desde ± 1.9 hasta ± 2.3 mm

Dorso/Ventral : desde -7.8 hasta -8.3 mm

4.1.6. Expresión de los resultados y análisis estadístico

En todos los experimentos, los resultados se expresan como distancia media recorrida (en cm) a lo largo de los 20 min de la sesión experimental, junto con su error estándar (EE).

El nivel de significación seleccionado fue siempre igual o inferior a 0.05. Todos los análisis estadísticos se han realizado con el programa informático SPSS en sus versiones 15.0 y 20.0.

Experimentos 1, 3, 4 y 5

El análisis estadístico de los resultados se abordó en estos experimentos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías siendo los factores analizados: **pretratamiento** (dosis de DP (4 niveles) en el experimento **1A**; dosis de DP (2 niveles) en el experimento **1B**; salino o CI en el experimento **3**; salino o DP en el experimento **4A**; salino o AZ en el experimento **4B**; aCSF o β -FNA en el experimento **5**) y **tratamiento** (aCSF o EtOH 150 en el experimento **1A**; aCSF o DAMGO en el experimento **1B**; aCSF o EtOH 35 en los experimentos **3, 4 y 5**). 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.

Materiales y métodos

Experimento 2

El análisis de los efectos de la administración intra-VTA de una dosis baja de etanol, 35 nmoles, sobre la actividad locomotora se realizó mediante una *t* de Student para datos no apareados.

Experimento 6A

Con objeto de analizar los efectos de la administración intra-VTA de diferentes dosis de BIC sobre la actividad locomotora de los animales, se analizó la distancia total recorrida durante la sesión experimental mediante una ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett.

Experimento 6B

El análisis de los resultados de este experimento se realizó mediante un ANOVA de tres vías donde los factores analizados fueron: **pretratamiento 1** (salino o DP), **pretratamiento 2** (aCSF o BIC) y **tratamiento** (aCSF o EtOH 35). Cuando en dicho análisis se detectó alguna interacción significativa, se realizaron las comparaciones correspondientes para contrastar las dos hipótesis nulas iniciales (H_0): (H_{0-1}) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol no difiere entre el grupo pretratado con salino + BIC y el grupo pretratado con salino + aCSF y, (H_{0-2}) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol no difiere entre el grupo pretratado con DP + BIC y el grupo pretratado con DP + aCSF. El rechazo de estas dos hipótesis nulas apoyaría nuestra hipótesis de trabajo.

El secuestro del acetaldehído como una nueva estrategia terapéutica para la prevención de la recaída en el alcoholismo

4.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIRECAÍDA DE LA D-PENICILAMINA: MEDIDA DEL FENÓMENO ADE EN EL MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE

En la actualidad, el arsenal terapéutico disponible para la prevención de la recaída en el consumo de alcohol es claramente limitado y de eficacia reducida (European Medicine Agency (EMA) 2010; Leggio *et al*, 2010; Litten *et al*, 2012), existiendo un **amplio reconocimiento**, tanto por las autoridades sanitarias como por los clínicos en ejercicio, **de la necesidad de desarrollar nuevas farmacoterapias. Dada la relevancia del ACD en los efectos neurobiológicos del etanol, los agentes secuestrantes de dicho metabolito se postulan como una nueva y prometedora estrategia a investigar.** En ese sentido, estudios recientes de nuestro grupo (Orrico *et al*, 2013; 2014a) muestran que la administración subcutánea de DP en infusión continua es capaz de prevenir el ADE tras un periodo de abstinencia en animales con un largo historial de consumo de etanol, lo que sugiere que esta sustancia podría ser eficaz en su extrapolación a la clínica. Continuando con esta línea de investigación, en este estudio se ha pretendido confirmar, mediante un paradigma preclínico alternativo, la eficacia antirecaída de este compuesto, siguiendo así las recomendaciones dictadas por investigadores e instituciones internacionales de reconocido prestigio en el campo de la

Materiales y métodos

terapéutica del alcoholismo. Con este fin se diseñaron los siguientes experimentos:

- I. **Experimento 1:** Evaluación del **fenómeno ADE en los animales.**

- II. **Experimento 2:** Evaluación de la **eficacia antirecaída de la DP** tras su administración sistémica.

- III. **Experimento 3:** Efectos de la **DP y la autoadministración de etanol en la actividad locomotora.**

- IV. **Experimento 4:** Determinación de los niveles de **etanol en plasma.**

4.2.1. Animales de experimentación

El animal de experimentación empleado para la realización de este trabajo ha sido la **rata albina macho de raza Wistar** (Harlan®, Barcelona, España). Los animales (n=40) contaban con un peso comprendido entre los 450-550 g en el momento de realizar los experimentos.

Los animales incluidos en este estudio se estabularon en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, situado en la Facultad de Psicología, en grupos de cuatro en cajas de polipropileno (48 x 38 x 21 cm³). Se mantuvieron en condiciones de humedad (60 %) y temperatura (22 ± 1 °C) controladas y bajo un **ciclo invertido de luz y oscuridad 12-12 horas** (conexión de 20:00 a 8:00 h). El acceso al agua y comida fue *ad libitum* excepto durante el periodo de entrenamiento (especificado en el apartado 4.2.3). Todos los procedimientos de trabajo han sido revisados y aprobados por el Comité Ético de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid y se han realizado cumpliendo con todas las normas vigentes sobre experimentación animal (Directiva 2010/63/UE, transpuesta en España a través del RD 53/2013).

Materiales y métodos

4.2.2. Soluciones de trabajo y agente farmacológico ensayados

SOLUCIONES DE TRABAJO

Soluciones de etanol

Las diferentes soluciones de etanol utilizadas conteniendo 2, 4, 6, 8 y 10 % de etanol en agua (v/v), se prepararon mediante dilución de etanol 99% suministrado por Alcoholes Aroca (Madrid, España).

Soluciones de sacarina

Las distintas soluciones de sacarina de concentraciones: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 y 1 % (p/v), se obtuvieron mediante dilución de sacarina sódica, proporcionada por Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA), en agua.

AGENTE FARMACOLÓGICO

El agente secuestrante del ACD, **DP**, fue suministrado por Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). Para su **administración i.p.**, se disolvió convenientemente en salino fisiológico en función de la dosis deseada.

4.2.3. Procedimientos experimentales

Autoadministración operante de etanol

Material empleado

Tanto la fase de entrenamiento como la fase experimental se realizaron en cámaras operantes modulares (cajas de condicionamiento operante) localizadas en cubículos que atenúan del sonido (Letica, LE modelo 850; Panlab, Barcelona, España y Med Associates Inc., St. Albans, VT, EE.UU.), intentando evitar la asociación de señales visuales o auditivas con la presión de la palanca. Los ventiladores se inactivaron ya que aumentan la tasa de evaporación del etanol. Las cajas contaban con un reservorio de bebida, posicionado a 4 cm del suelo en el centro del panel frontal, y con dos palancas retráctiles, situadas a 7 cm del suelo, a la derecha e izquierda del receptáculo de bebida (*Figura 4.12*). Las palancas fueron contrabalanceadas en su funcionamiento para responder como palanca inactiva (no libera líquido), o como palanca activa (liberando tras su accionamiento 0.1 ml de líquido en el receptáculo). El contenido del reservorio permaneció accesible para el animal hasta la siguiente presión efectiva de la palanca, para la cual debían transcurrir al menos 2.5 segundos. Las posiciones de las palancas activa e inactiva se mantuvieron constantes para cada animal durante la fase de entrenamiento y la experimental. Las respuestas en ambas palancas se registraron durante los 30 minutos de cada sesión con la ayuda de un programa informático (Universidad Complutense de Madrid) que controlaba las cajas. El programa registraba, de forma acumulativa, el número de

Materiales y métodos

respuestas por minuto hasta el final de la sesión experimental. Todas las sesiones de autoadministración se realizaron bajo un procedimiento de razón fija 1 (FR 1), según se explica a continuación.



Figura 4.12. Imagen del interior de la caja de condicionamiento operante empleada.

La habitación donde estaban situadas las cajas de condicionamiento se iluminó únicamente con luz roja, manteniendo así el ciclo de oscuridad de los animales.

Entrenamiento de los animales

El aprendizaje de la tarea de autoadministración del etanol, se consiguió mediante el empleo de un protocolo de entrenamiento que se basaba en el uso de sacarina inicialmente y soluciones alcohólicas con sacarina en fases posteriores.

Materiales y métodos

El protocolo se inició con un periodo de privación de agua durante 11 horas (de 2 a 4 días consecutivos dependiendo del grado de aprendizaje del animal) y la introducción de los animales en la caja de condicionamiento operante, donde la presión de la palanca activa suponía la liberación de 0.1 ml de una solución de sacarina al 1 % (p/v), siguiendo un programa de refuerzo FR 1. Tras estos 2-4 días iniciales, los animales dispusieron de agua *ad libitum* en sus cajas de estabulación y continuaron con las sesiones de aprendizaje hasta que la totalidad de los animales alcanzó un tasa estable de respuestas (lo que se consiguió tras 18-20 días de entrenamiento).

Tras esta fase inicial de aprendizaje de la tarea de palanqueo, las ratas se entrenaron para la autoadministración oral de etanol utilizando una modificación del método propuesto por Samson y colaboradores (Samson *et al*, 1999), según la siguiente secuencia:

Solución empleada	Número de sesiones
0.1 % sacarina y 2 % etanol	3
0.08 % sacarina y 4 % etanol	3
0.06 % sacarina y 6 % etanol	4
0.04 % sacarina y 8 % etanol	4
0.02 % sacarina y 10 % etanol	4
10 % etanol	46

Transcurridas las 64 sesiones de consumo de etanol, se observó una tasa de respuesta estable en los animales.

Materiales y métodos

Análisis de la actividad motora

Con el fin de habituar a los animales, tanto al ambiente como al equipo donde se realizaría el ensayo, el día previo y tras finalizar la sesión de autoadministración, los animales se trasladaron a la habitación donde se realizaría el ensayo, iluminada con luz roja para mantener el ciclo de oscuridad. Allí los animales permanecieron 20 minutos en cajas individuales (habitación al ambiente) y 10 minutos dentro del actímetro. El día del ensayo, los animales se sacaron de las cajas de condicionamiento operante y se trasladaron en jaulas individuales a la habitación donde se realizó, inmediatamente, el ensayo de actividad motora. La actividad motora se evaluó en un actímetro constituido por 6 cajas rectangulares, de 40 x 35 x 35 cm³, que contaban con 8 fotocélulas cada una dispuestas en dos filas (a 4 y 8 cm del suelo). Este sistema estaba conectado con un software (Universidad Complutense de Madrid) que registraba, de forma acumulativa en fracciones de 5 minutos, las veces que el animal atravesaba los haces infrarrojos, aportando información de la actividad en el eje horizontal, eje vertical (plantadas) y la actividad total (suma de la actividad en ambos planos).

Determinación de los niveles plasmáticos de etanol

Finalizada la sesión de autoadministración, los animales se sacrificaron mediante decapitación. Se recogieron 2 ml de sangre del tronco en tubos que contenían EDTA tri-potásico (K_3EDTA 7.2 mg) como anticoagulante (VACUTEST® KIMA s.r.l., Arzergrande, Italia) y se centrifugó a 1500x g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada. A continuación, se recogió el plasma y se almacenó a $-80^{\circ}C$ hasta el momento del análisis. La determinación de los niveles de etanol se realizó en placas de 96 pocillos mediante el kit comercial *EnzyChrom™ Ethanol Assay (ECET-100)* (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA), de acuerdo al protocolo especificado por el fabricante. El análisis se basa en la reacción de oxidación del etanol a ACD, catalizada por la enzima ADH. En esta reacción se genera NADH al cual se le acopla el cromógeno Formazan (MMT). La intensidad del color generada, determinada por espectrofotometría a 565 nm, es proporcional a la concentración (mg/dl) de etanol en la muestra.



4.2.4. Planteamiento y diseño experimental

Experimento 1: Evaluación del fenómeno ADE en los animales

El paso previo a la evaluación de la eficacia antirecaída del tratamiento a ensayo (DP), fue comprobar la aparición de la recaída y del fenómeno ADE en nuestras condiciones experimentales. El ensayo se inició **transcurridos 64 días** desde el inicio del entrenamiento con alcohol, cuando los **40 animales** habían alcanzado una tasa de respuesta estable para la palanca activa. Los datos obtenidos a partir de los **últimos 5 días** de consumo de etanol 10 % (del día 60 al 64) sirvieron para el cálculo del consumo basal, que pasará a denominarse **Basal 1** de aquí en adelante. El protocolo seguido a continuación (con la denominación dada a las fases correspondientes) fue el siguiente:

- **Abstinencia 1:** durante un periodo de **7 días** (días 65 a 71) la autoadministración fue suspendida y con ello el acceso al etanol. Los animales permanecieron en sus jaulas de estabulación con acceso a comida y agua *ad libitum*.
- **Reintroducción 1:** tras la privación impuesta en la Abstinencia 1, todos los animales fueron introducidos de nuevo en las cajas de condicionamiento operante con el fin de registrar las respuestas de ambas palancas durante los 30 minutos de cada sesión. Los

datos procedentes de los **primeros 5 días post-reintroducción** (días 72 a 76) sirvieron para estudiar la aparición del fenómeno ADE en los animales.

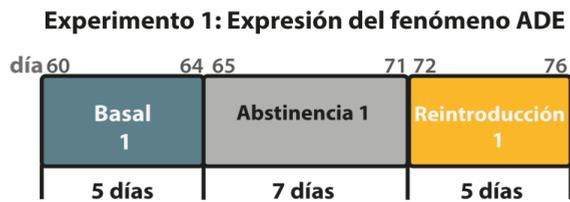


Figura 4.13. Esquema del protocolo temporal seguido en el experimento 1.

Materiales y métodos

Experimento 2: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica

Una vez confirmada la manifestación del fenómeno ADE en nuestras condiciones experimentales, se estudió la eficacia de la DP para prevenir dicho fenómeno después de un segundo ciclo de abstinencia/reintroducción. Tras la Reintroducción 1, los **40 animales** siguieron con las sesiones habituales de autoadministración de etanol, en sesiones de 30 minutos, durante 21 días, de forma que la tasa de respuesta para el etanol volvió a estabilizarse. Normalizadas las respuestas, se pasó a definir el **Basal 2** (días 98 a 102). En este caso, y a diferencia del Basal 1, durante los 5 días que permitieron definir el nuevo consumo basal de etanol, **los animales recibieron la administración i.p. de salino** 30 minutos antes de iniciar cada sesión de autoadministración, con el fin de tener las mismas condiciones experimentales durante el periodo basal y la reintroducción. Tras definir el Basal 2, el protocolo continuó de la siguiente forma:

- **Abstinencia 2:** se instauró un nuevo periodo sin acceso al etanol durante **7 días**, donde los animales permanecieron en sus jaulas de estabulación con acceso libre a comida y agua. En los **3 últimos días** de este periodo de abstinencia (días 107 a 109), todos los animales recibieron una **inyección i.p. de salino diaria**.

- **Reintroducción 2:** los 40 animales empleados llegaron a esta fase distribuidos en 4 grupos experimentales, de forma que presentaran un número similar de respuestas durante el periodo Basal 2. Los animales recibieron una administración diaria de **DP 0** (es decir, **salino**), **6.25**, **12.5** o **25 mg/kg i.p.** (n=10/grupo), 30 minutos antes del inicio de la sesión de autoadministración, durante **5 días consecutivos**. El número de respuestas registradas durante los 30 minutos/sesión de estos 5 días post-reintroducción se utilizó para estudiar el efecto de la DP en la prevención de la recaída, evaluada a través del ADE.

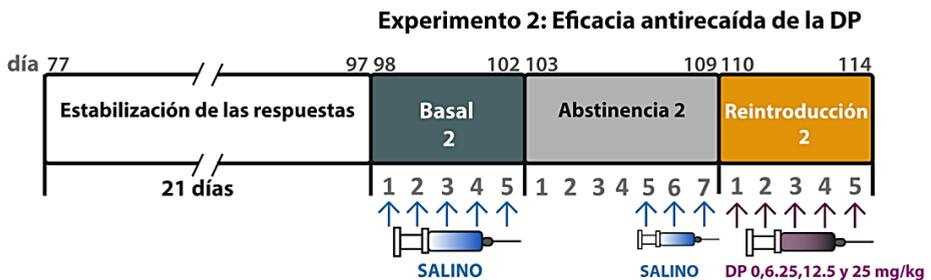


Figura 4.14. Esquema del protocolo temporal seguido en el experimento 2.

Materiales y métodos

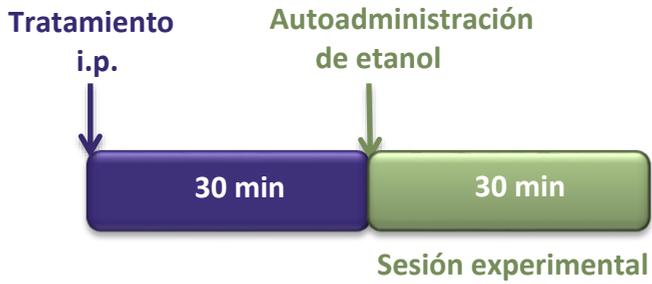


Figura 4.15. Protocolo experimental seguido en el experimento 2 los 5 días post-Reintroducción 2.

Tanto las dosis como el protocolo temporal fueron seleccionadas de acuerdo con estudios publicados previamente (Font *et al*, 2005) y los resultados obtenidos en el experimento 1A del apartado anterior.

Experimento 3: Efectos de la DP y la autoadministración de etanol en la actividad locomotora

Con el fin de descartar la posibilidad de que la reducción en el número de respuestas observada en el grupo tratado con la dosis más elevada de DP ensayada (25 mg/kg) pudiera deberse a una afectación de la actividad motora, se analizó la actividad exploratoria de los animales tratados con **salino (DP 0) y DP 25 mg/kg** (n= 10/grupo). Así, tras la finalización de la **quinta sesión de autoadministración en la Reintroducción 2**, se estudió la actividad motora horizontal, vertical (plantadas) y total en los 20 animales incluidos en el estudio, durante los 20 minutos inmediatamente posteriores al ensayo de autoadministración.



Figura 4.16. Protocolo experimental seguido en el experimento 3 el día 5 post-Reintroducción 2.

Materiales y métodos

Experimento 4: Determinación de los niveles de etanol en plasma

Esta determinación analítica se planteó con el objetivo de validar, en nuestras condiciones experimentales, la correlación entre las respuestas ejecutadas por el animal y los niveles de etanol presentes en plasma. Para ello, finalizados los experimentos y durante el **día 6 post-Reintroducción 2**, se procedió de la misma forma que los días previos. Brevemente, se le administró a cada animal el tratamiento correspondiente, dependiendo del grupo experimental (DP 0, 6.25, 12.5 o 25), y transcurridos 30 minutos fueron introducidos en la caja de condicionamiento operante para ejecutar la tarea de autoadministración de etanol. Finalizados los 30 minutos de la sesión experimental, los animales se sacrificaron mediante decapitación, se recogió la **sangre del tronco** (2 ml) para obtener el plasma que se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Mediante el kit comercial *EnzyChrom™ Ethanol Assay (ECET-100)* (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA), según el protocolo descrito en el apartado anterior, se determinaron los niveles plasmáticos de etanol (mg/dl) en los **40 animales** del estudio.

Materiales y métodos

A continuación se muestra el esquema global del protocolo seguido en los distintos experimentos detallados en este apartado.

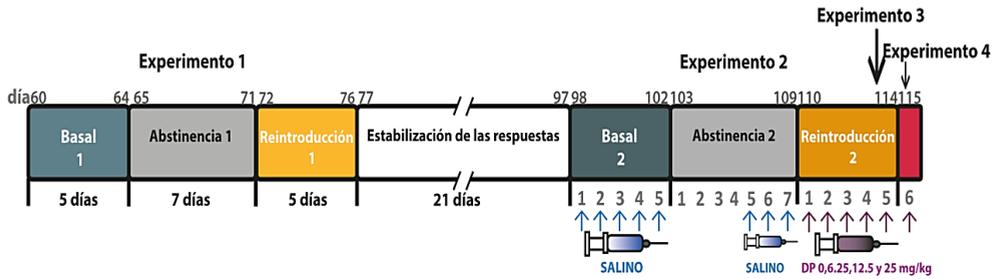


Figura 4.17. Esquema del protocolo temporal seguido en los experimentos del apartado 4.2

4.2.5. Expresión de los resultados y análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se han realizado con el programa informático SPSS en sus versiones 20.0 y 22.0. El nivel de significación seleccionado fue siempre igual o inferior a 0.05.

Experimento 1

Los resultados se han expresado como la media del número de respuestas, de la palanca activa e inactiva, acompañado de su EE durante los 30 minutos de la sesión experimental, a lo largo de los 10 días (Basal 1 + Reintroducción 1) del experimento. Además, para facilitar la visualización de los resultados, también se han agrupado las respuestas, (por separado para las palancas activa e inactiva) de los 5 días del periodo Basal 1 y de los 5 días post-Reintroducción 1, expresándolas como respuesta media a lo largo de los 5 días de cada periodo con su EE. En ambos casos se han considerado conjuntamente el total de los animales (n=40).

El análisis estadístico de los resultados se abordó mediante un ANOVA de una vía con medidas repetidas, siendo el factor analizado el tiempo (10 días). En el caso de las respuestas agrupadas, el análisis se realizó mediante una t de Student para datos apareados.

Experimento 2

En este experimento los datos se han expresado tal y como se ha descrito en el apartado anterior, aunque en este caso, se han mostrado los resultados correspondientes a cada grupo experimental ($n=10/\text{grupo}$, 4 grupos) obtenidos en las fases Basal 2 y Reintroducción 2.

Respecto al análisis estadístico, aunque inicialmente se analizó el efecto de la DP en la expresión del fenómeno ADE mediante un ANOVA mixto de dos vías, las matrices de covarianza de la variable dependiente (número de respuestas) fueron diferentes entre los grupos (Box–Pierce test; $p<0.0001$), por lo que los resultados se analizaron, como en el apartado anterior, usando un ANOVA de una vía con medidas repetidas por cada grupo experimental. Ante el incumplimiento del supuesto de esfericidad, el ANOVA de medidas repetidas se corrigió de acuerdo a la aproximación de Huynh-Feldt (Keselman *et al*, 1980). Las respuestas agrupadas, tanto en el 1^{er} como en el 2^o ADE se analizaron mediante una t de Student para datos apareados.

Materiales y métodos

Experimento 3

Los resultados de la actividad motora horizontal, vertical (plantadas) y total, se han expresado como el promedio del número de veces que los animales, en los dos grupos experimentales analizados (DP 0, n=10 y DP 25, n=10), cortaban los haces de luz infrarroja durante los 20 minutos del ensayo acompañado de su EE. En todos los casos la comparación de la actividad entre ambos grupos se realizó mediante una t de Student para datos no apareados.

Experimento 4

La relación entre los niveles de etanol en plasma (mg/dl) y el número de respuestas de la palanca activa se ha analizado mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

5. RESULTADOS

*Efectos neuroconductuales del etanol en el sistema
mesocorticolímbico dopaminérgico*

**5.1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROCONDUCTUALES
DEL ETANOL ADMINISTRADO EN VTA: PAPEL DEL
ACETALDEHÍDO Y DE LA FRACCIÓN NO
METABOLIZADA DEL ETANOL**

**5.1.1. Experimento 1: Efectos del secuestro del
acetaldehído sobre la activación motora
derivada de la administración intra-VTAp de
etanol**

**Experimento 1A: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina
sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTAp
de etanol**

- **Validación histológica**

Finalizada la evaluación histológica de los cerebros de los animales empleados en este experimento, 4 animales, de los 64 inicialmente incluidos, fueron desestimados: 1 perteneciente al grupo DP 12.5 + EtOH 150, 1 del grupo DP 25 + EtOH 150, 1 del grupo DP 50 + aCSF y 1 del grupo DP 50 + EtOH 150. En la *Figura 5.1* se muestra la posición de las cánulas de los animales finalmente incluidos en el experimento:

Resultados

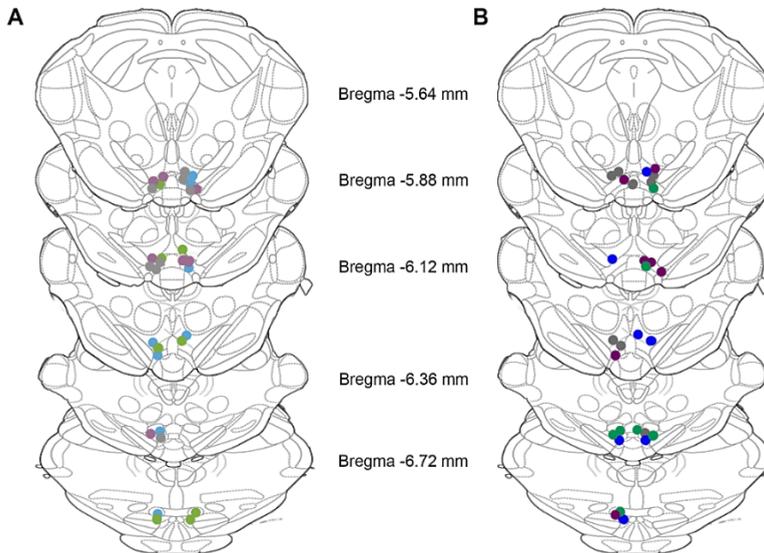


Figura 5.1. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTA en los animales del experimento 1A. En el panel A se muestran los animales **tratados con aCSF** siendo los grupos experimentales: DP 0 + aCSF (*gris claro*), DP 12.5 + aCSF (*azul claro*), DP 25 + aCSF (*verde claro*) y DP 50 + aCSF (*morado claro*). En el **panel B** se muestran los animales **tratados con ETOH** según la siguiente distribución: DP 0 + EtOH 150 (*gris oscuro*), DP 12.5 + EtOH 150 (*azul oscuro*), DP 25 + EtOH 150 (*verde oscuro*) y DP 50 + EtOH 150 (*morado oscuro*). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

Como era de esperar, en base a los estudios realizados previamente por nuestro grupo (Sanchez-Catalan *et al*, 2009), la administración de 150 nmoles de etanol directamente en VTAp incrementó significativamente la actividad motora de las ratas respecto a lo observado en los animales del grupo control (*Figura 5.2*). Sin embargo, cuando los animales fueron pretratados con el agente secuestrante del ACD por vía i.p., el incremento de la actividad motora fue reducido o completamente suprimido. Como se aprecia en la *Figura 5.2*, la acción de la DP sobre la activación motora inducida por el etanol parece ser dosis-dependiente.

El análisis estadístico de los resultados, mediante un ANOVA de dos vías, confirmó 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 reveló una **reducción significativa en la actividad motora de los animales pretratados con 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 del grupo control pretratados con salino i.p. (DP 0 en la *Figura 5.2*). Cabe destacar, que tras el análisis no se detectaron diferencias significativas entre la actividad registrada en los animales microinyectados con aCSF para las distintas dosis de DP ensayadas, lo que sugiere que la administración de **DP no deprime per se la actividad motora de los animales**.

La inspección de la *Figura 5.2* muestra que, la actividad motora de los animales pretratados con DP 25 o 50 mg/kg y tratados con EtOH tiende a ser

Resultados

inferior que la obtenida en los respectivos grupos tratados con aCSF. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos no detectó diferencias significativas entre las medias (pretratamiento con DP 25, $p=0.182$; pretratamiento con DP 50, $p=0.201$).

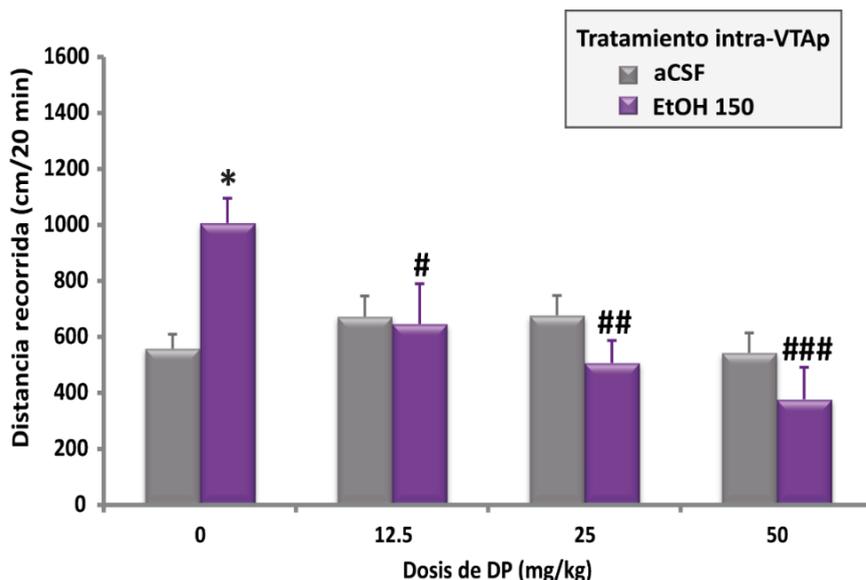


Figura 5.2. Efecto del secuestro del ACD en la actividad locomotora de las ratas tras la administración de 150 nmoles de etanol. Los datos se muestran como media \pm EE y representan la distancia, expresada en cm, recorrida en 20 minutos tras la administración intra-VTAp de aCSF o 150 nmoles de etanol (EtOH 150), en animales que recibieron por vía i.p. diferentes dosis de D-Penicilamina (DP) (0, 12.5, 25 y 50 mg/kg) 30 minutos antes de la administración de etanol ($n=7-8$ /grupo). La almohadilla indica diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en el grupo de animales que recibieron DP 0 + EtOH 150 (# $p<0.05$; ## $p\leq 0.001$; ### $p<0.0001$). El asterisco indica diferencias significativas respecto a su respectivo grupo aCSF (* $p\leq 0.01$).

Experimento 1B: Efecto de la administración sistémica de D-Penicilamina sobre la activación locomotora inducida por la administración intra-VTA de DAMGO

- **Validación histológica**

El análisis histológico de los cortes procedentes de los 32 animales inicialmente incluidos en el experimento obligó a excluir tan solo a 1 animal perteneciente al grupo DP 50 + 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 5.3*.

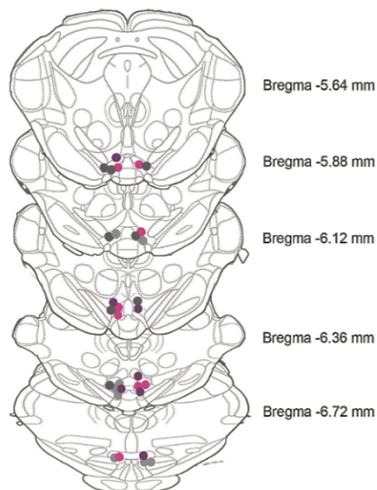


Figura 5.3. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTA en los animales del experimento 1B. Los grupos experimentales son: DP 0 + aCSF (gris claro), DP 0 + DAMGO (magenta), DP 50 + aCSF (gris oscuro) y DP 50 + DAMGO (magenta oscuro). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

Resultados

- **Análisis de la actividad locomotora**

Como puede observarse en la *Figura 5.4*, la administración intra-VTAp de 0.013 nmoles de DAMGO incrementó la actividad motora de las ratas en los dos grupos experimentales estudiados, respecto a la actividad observada en los animales de sus respectivos grupos control. Además, el **pretratamiento con DP i.p. (50 mg/kg) 30 minutos antes de la administración intra-VTAp de DAMGO**, según se observa en la figura, **no pareció alterar la activación motora inducida por este agonista selectivo de los MORs**.

El análisis estadístico confirmó estas observaciones. El ANOVA de dos vías reveló diferencias estadísticamente significativas solo para el efecto principal, tratamiento con DAMGO [$F(1,26) = 27.521$; $p < 0.001$]. El análisis de los efectos principales, utilizando la corrección de Bonferroni, confirmó el aumento significativo en la actividad locomotora de las ratas pertenecientes al grupo DP 0 + DAMGO 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 tratados con DP 50 + DAMGO respecto a la obtenida en los animales tratados con DP 50 + aCSF [$F(1,26) = 11.354$; $p = 0.002$], corroborando la **selectividad de la acción de la DP sobre la actividad motora inducida por el ACD derivado del etanol**.

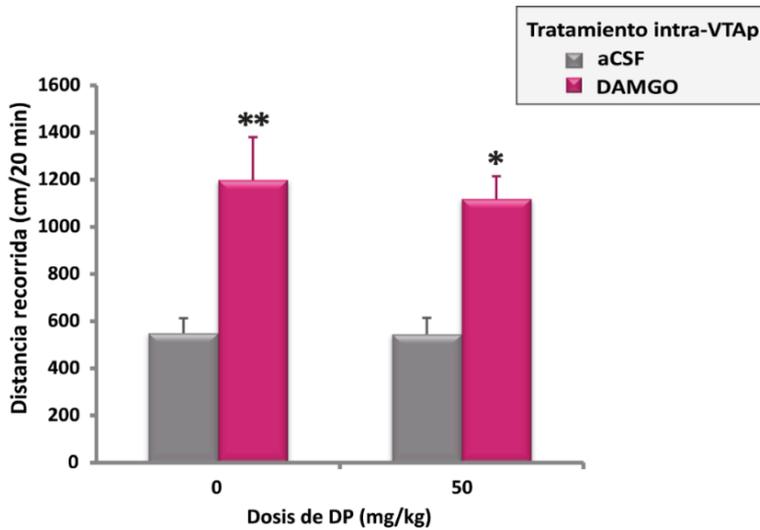


Figura 5.4. Efecto de la administración de DP sobre la actividad locomotora de las ratas tras la administración del agonista de los MORs DAMGO. Distancia recorrida, expresada en cm, durante los 20 min de la sesión experimental en las ratas pretratadas por vía i.p. con salino (DP 0) o D-Penicilamina 50 mg/kg (DP 50), 30 minutos antes de la administración intra-VTAp de DAMGO (0.013 nmoles) o aCSF. Los valores se expresan como media \pm EE (n= 7-8 animales/grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo control correspondiente (* $p \leq 0.01$; ** $p < 0.001$).

Resultados

5.1.2. Experimentos 2, 3 y 4: Estudio de los efectos del acetaldehído y la fracción no metabolizada del etanol en la actividad de las neuronas dopaminérgicas: Evaluación mediante la conducta motora de la rata

Experimento 2: Selección de la dosis de etanol a administrar

- Validación histológica

Tras el análisis histológico de los cortes cerebrales, se verificó que todos los animales inicialmente incluidos en el estudio (n=10) mostraban un correcto posicionamiento de la cánula en VTAp. La posición del extremo distal de los inyectores se muestra esquemáticamente en la *Figura 5.5*.

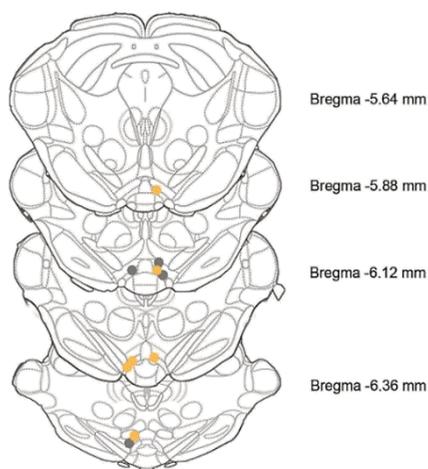


Figura 5.5. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 2. Los grupos experimentales son: aCSF (gris) y EtOH 35 (amarillo). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

A diferencia de lo observado en estudios previos de nuestro grupo (Sanchez-Catalan *et al*, 2009) y en el experimento 1A, donde las dosis de 75 y 150 nmoles de etanol inducían una activación motora en los animales, los resultados de este experimento muestran que **la administración intra-VTAp de 35 nmoles de etanol no modificó la actividad basal de los animales**. En la *Figura 5.6* puede observarse como la administración de etanol no alteró la distancia media recorrida por los animales tratados, respecto a las ratas del grupo control. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0.755$). Por tanto, seleccionamos la dosis de 35 nmoles de etanol para la realización de los experimentos subsecuentes.

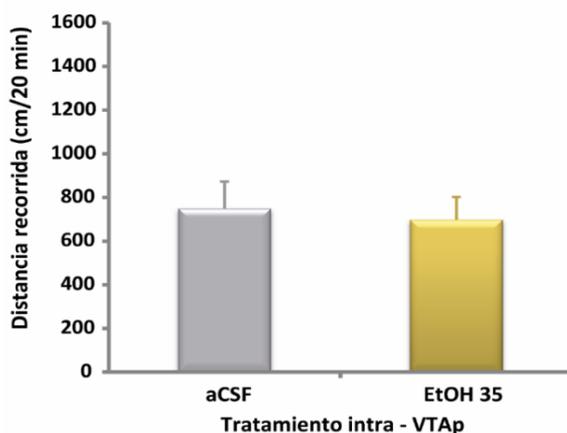


Figura 5.6. Efecto de una dosis de 35 nmoles de etanol sobre la actividad motora de las ratas. Los datos de distancia recorrida, expresada en cm, durante los 20 min de la sesión experimental tras la administración intra-VTAp de aCSF ($n=4$) y 35 nmoles de etanol (EtOH 35) ($n=6$), están representados como media \pm EE.

Resultados

Experimento 3: Estrategia farmacológica diseñada para incrementar los niveles de acetaldehído en VTAp

- Validación histológica

Únicamente un animal perteneciente al grupo CI 10 + EtOH 35 mostró un posicionamiento incorrecto de la cánula durante el análisis histológico, consecuentemente fue excluido del análisis estadístico. En la *Figura 5.7* se muestra la posición del extremo distal de la cánula de los 23 animales restantes incluidos en el estudio.

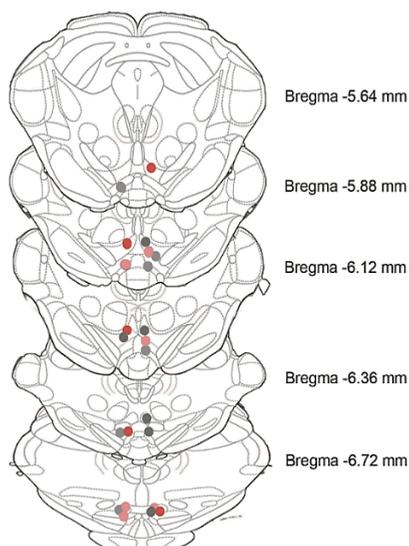


Figura 5.7. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de ratón en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 3. Los grupos experimentales son: salino + aCSF (gris claro), salino + EtOH 35 (rosa), CI 10 + aCSF (gris oscuro) y CI 10 + EtOH 35 (rojo). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

Si la activación motora derivada de la administración intra-VTAp de etanol depende de la prevalencia de los efectos excitatorios inducidos por el ACD, sobre los efectos depresores derivados de la fracción no metabolizada del etanol; es lógico suponer que el incremento en los niveles cerebrales de ACD, derivado del bloqueo de la enzima ALDH con CI (Jamal *et al*, 2003a; 2003d; 2007), debería originar un incremento en la actividad motora de los animales tratados con 35 nmoles de etanol (una dosis inactiva a nivel de la conducta motora).

En la *Figura 5.8* se muestra como, de conformidad con la hipótesis planteada, el **pretratamiento con CI (10 mg/kg) modifica los efectos que la dosis de 35 nmoles de etanol ejerce sobre la actividad motora en comparación con el grupo pretratado con salino, al convertirla en una dosis estimulante de la actividad motora.**

El análisis estadístico permitió detectar diferencias significativas para el efecto pretratamiento [$F(1,19)= 4.662$; $p= 0.044$] y para la interacción pretratamiento x tratamiento [$F(1,19)= 4.483$; $p= 0.048$], sin embargo, el factor tratamiento no fue significativo [$F(1,19)= 4.136$; $p= 0.056$]. El posterior análisis de los efectos principales confirmó que la actividad motora de los animales tratados con aCSF no difirió entre ambos pretratamientos ($p= 0.976$), indicando que **el pretratamiento con CI no modifica la actividad basal de los animales.** Además, la distancia media recorrida por los animales pretratados con salino no fue diferente entre ambos tratamientos ($p= 0.952$), confirmando que **la administración intra-VTAp de 35 nmoles de etanol no**

Resultados

modifica la actividad motora de las ratas. Cabe destacar que cuando los animales fueron pretratados con CI, la distancia media recorrida por los animales que recibieron etanol fue superior a la observada en los animales tratados con aCSF ($p= 0.010$), sugiriendo la aparición de una activación motora. De forma similar, la actividad de los animales pretratados con CI fue superior a la registrada en los animales pretratados con salino cuando ambos grupos fueron tratados con etanol ($p= 0.008$).

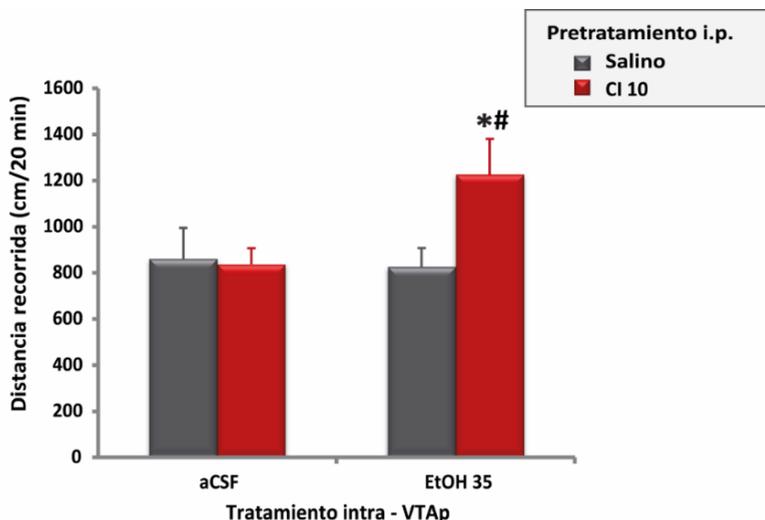


Figura 5.8. Efecto de la inhibición de la enzima ALDH en la actividad locomotora de las ratas tras la administración de 35 nmoles de etanol. Los datos de distancia recorrida, expresada en cm, durante los 20 min de la sesión experimental en las ratas pretratadas i.p. con salino o cianamida 10 mg/kg (CI 10), 60 minutos antes de la administración intra-VTAp de aCSF o 35 nmoles de etanol (EtOH 35), se muestran como media \pm EE ($n= 5-6$ animales/grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo pretratado con salino (* $p<0.01$). La almohadilla denota diferencias significativas respecto a los animales tratados con aCSF (# $p\leq 0.01$).

Experimento 4: Estrategias farmacológicas diseñadas para reducir los niveles de acetaldehído en VTAp

Experimento 4A: Efecto de la administración intra-VTAp de una dosis baja de etanol sobre la actividad motora de animales pretratados con D-Penicilamina

- **Validación histológica**

El análisis histológico de los cortes procedentes de los animales inicialmente incluidos en el experimento obligó a excluir tan solo 1 animal perteneciente al grupo DP 50 + EtOH 35. Las posiciones de los extremos distales de los inyectores en los 27 animales finalmente incluidos en el presente experimento se muestran esquemáticamente en la *Figura 5.9*.

Resultados

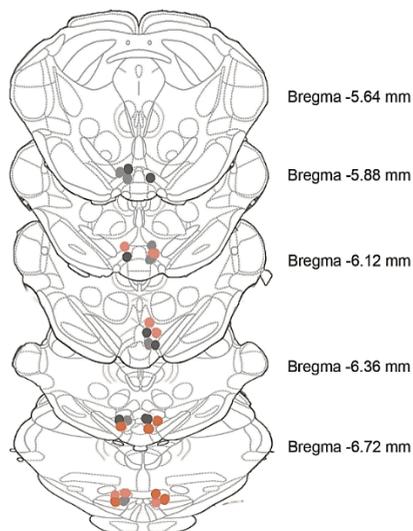


Figura 5.9. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTA en los animales del experimento 4A. Los grupos experimentales son: salino + aCSF (gris claro), salino + EtOH 35 (naranja claro), DP 50 + aCSF (gris oscuro) y DP 50 + EtOH 35 (naranja). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

En la *Figura 5.10* puede observarse como el pretratamiento i.p. con DP 50 mg/kg (DP 50), modifica el efecto que una dosis baja de etanol (35 nmoles) produce sobre la actividad motora de los animales, en comparación con el grupo pretratado con salino. Los resultados de este experimento muestran que, **la reducción en los niveles de ACD en VTA mediante el agente secuestrante DP, convierte a la dosis de 35 nmoles de etanol, inicialmente inefectiva, en una dosis depresora desde el punto de**

vista locomotor. De acuerdo con la hipótesis planteada, la reducción de los niveles de ACD permite reducir los efectos activadores derivados de la fracción metabolizada del etanol.

El análisis, mediante un ANOVA de dos vías, mostró diferencias estadísticamente significativas en la interacción pretratamiento x tratamiento [$F(1,22)= 7.526$; $p= 0.012$], sin embargo, ni el factor pretratamiento ni el factor tratamiento se mostraron significativos [$F(1,22)= 3.725$; $p= 0.067$ y $F(1,22)= 2.887$; $p= 0.103$, respectivamente]. El análisis posterior de los efectos principales confirmó que la distancia media recorrida por los animales tratados con aCSF no difiere, independientemente del pretratamiento utilizado ($p= 0.468$), sugiriendo que el **pretratamiento con DP 50 mg/kg no modifica la actividad basal de los animales**. Además, la actividad locomotora de los animales pretratados con salino no difirió entre el grupo tratado con aCSF y el grupo tratado con etanol ($p= 0.556$), confirmando así que **la dosis de 35 nmoles de etanol no alteró la actividad motora de los animales**. No obstante, cuando los animales fueron pretratados con DP 50, la distancia media recorrida por los animales tratados intra-VTAp con etanol fue inferior a la recorrida por los animales tratados con aCSF ($p= 0.004$), indicando la **aparición de una depresión motora derivada de la administración de 35 nmoles de etanol, en condiciones de secuestro del ACD generado**. A su vez, la distancia media recorrida por los animales pretratados con DP fue inferior a la registrada en los animales pretratados con salino, cuando ambos grupos fueron tratados con etanol ($p= 0.005$).

Resultados

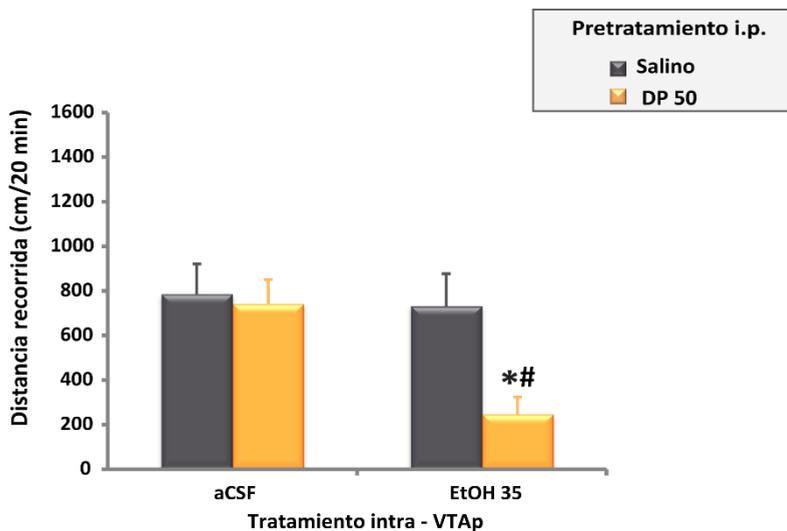


Figura 5.10. Efecto del secuestro del ACD sobre la actividad locomotora de las ratas tras la administración de 35 nmoles de etanol. Los datos de distancia recorrida durante los 20 min de la sesión experimental en ratas pretratadas i.p. con salino o D-Penicilamina 50 mg/kg (DP 50), 30 minutos antes de la administración intra-VTAp de aCSF o 35 nmoles de etanol (EtOH 35), se muestran como media \pm EE (n= 6-7 animales/ grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo pretratado con salino (* $p < 0.01$). La almohadilla denota diferencias significativas respecto a los animales tratados con aCSF (# $p < 0.01$).

Experimento 4B: Efecto de la administración intra-VTAp de una dosis baja de etanol sobre la actividad motora de animales pretratados con azida sódica

- **Validación histológica**

Finalizada la evaluación histológica de los cerebros de los animales empleados en este experimento, 3 animales fueron desestimados: 1 perteneciente al grupo salino + aCSF, 1 del grupo salino + EtOH 35 y 1 del grupo AZ 7 + aCSF. En la *Figura 5.11* se muestra la posición de la cánula de los 29 animales finalmente incluidos en el experimento:

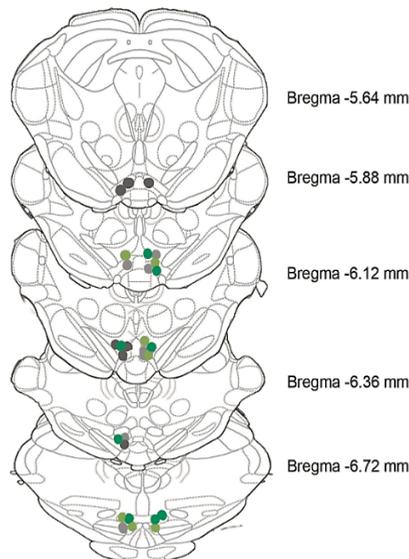


Figura 5.11. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de ratón en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 4B. Los grupos experimentales son: salino + aCSF (gris claro), salino + EtOH 35 (verde claro), AZ 7 + aCSF (gris oscuro) y AZ 7 + EtOH 35 (verde oscuro). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

Resultados

- **Análisis de la actividad locomotora**

Si nuestra hipótesis de la acción dual del etanol es correcta, el pretratamiento de los animales con AZ debería producir una reducción en la actividad motora de las ratas, de forma similar a lo observado en el experimento 4A.

En la *Figura 5.12* puede observarse como el efecto del etanol (35 nmoles) sobre la actividad motora de los animales difiere en función del pretratamiento realizado (AZ 7 mg/kg (AZ 7) o salino). **La administración previa del inhibidor de la CAT conduce a una disminución de la actividad motora en los animales tratados con 35 nmoles de etanol, respecto a los pretratados con salino.**

El análisis estadístico mostró diferencias significativas tanto para la interacción pretratamiento x tratamiento [$F(1,25)= 4.253$; $p= 0.05$] como para el factor pretratamiento [$F(1,25)= 4.740$; $p= 0.039$], sin embargo el ANOVA de dos vía no mostró significación para el factor tratamiento [$F(1,25)= 0.639$; $p= 0.432$]. La prueba de Bonferroni confirmó que la distancia media recorrida por los animales tratados con aCSF no difiere entre ambos pretratamientos ($p= 0.937$), indicando que **el pretratamiento con AZ (7 mg/kg) no modificó la actividad basal de los animales**. Asimismo, la distancia media recorrida por los animales pretratados con salino no difirió entre los tratamientos ($p= 0.388$), confirmando, una vez más, la **ausencia de efecto de la dosis de 35 nmoles de etanol, administrada intra-VTA, sobre la actividad motora de los animales**. En cambio, cuando los animales fueron pretratados con AZ, la actividad motora de las ratas tratadas con etanol fue

significativamente inferior a la obtenida en las ratas tratadas con aCSF ($p= 0.05$), confirmando la aparición de depresión motora. Además, la distancia media recorrida por los animales pretratados con AZ fue inferior a la registrada en los animales pretratados con salino, cuando el tratamiento en ambos grupos fue etanol ($p= 0.005$).

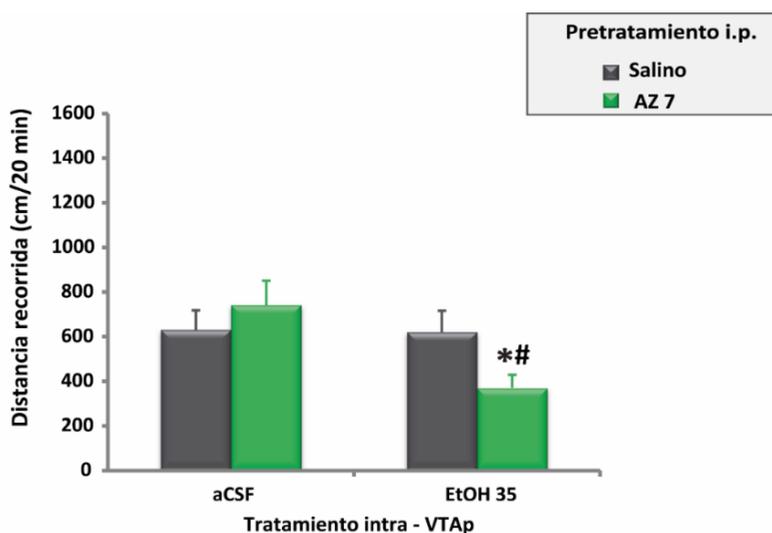


Figura 5.12. Efecto de la inhibición de la CAT en la actividad locomotora de las ratas tras la administración de 35 nmoles de etanol. Los datos de distancia recorrida, expresada en cm, durante los 20 min de la sesión experimental en ratas pretratadas i.p. con salino o azida sódica 7 mg/kg (AZ 7), 30 minutos antes del tratamiento intra-VTAp con aCSF o 35 nmoles de etanol (EtOH 35), se muestran como media \pm EE ($n= 7-8$ animales/ grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo pretratado con salino (* $p<0.01$). La almohadilla denota diferencias significativas respecto a los animales tratados con aCSF (# $p\leq 0.05$).

De acuerdo con los datos obtenidos, **la reducción en la producción de ACD en el VTAp derivado del bloqueo de la CAT, convierte la dosis de 35 nmoles de etanol, inicialmente inefectiva, en una dosis depresora de la actividad motora.**

Resultados

5.1.3. Experimento 5: Análisis de la implicación de los receptores opioides de tipo μ en la activación motora derivada de la administración de etanol

- Validación histológica

En la *Figura 5.13* se muestra la posición de la cánula de los 29 animales finalmente incluidos en el experimento tras la exclusión de 2 animales por el posicionamiento incorrecto de sus cánulas: 1 del grupo β -FNA 2.5 + aCSF y 1 del grupo β -FNA 2.5 + EtOH 35.

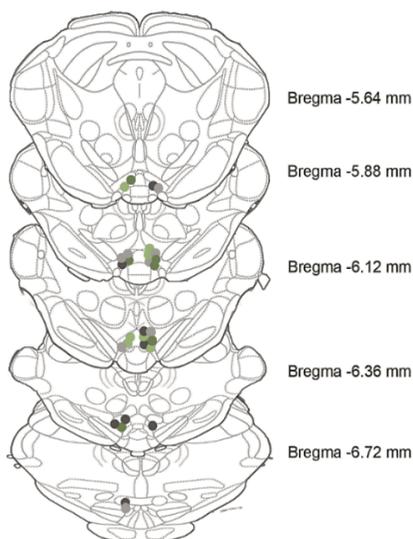


Figura 5.13. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 4B. Los grupos experimentales son: salino + aCSF (gris claro), salino + EtOH 35 (verde claro), β -FNA 2.5 + aCSF (gris oscuro) y β -FNA 2.5 + EtOH 35 (verde oscuro). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

En la *Figura 5.14* puede observarse la distancia media recorrida por los animales de cada uno de los grupos experimentales empleados en este experimento. Como puede apreciarse, los animales pretratados con β -FNA (2.5 nmoles) y tratados 24 horas más tarde con 35 nmoles de etanol, mostraron una reducción en su actividad motora respecto a la observado en los otros tres grupos experimentales (aCSF + aCSF, aCSF + EtOH 35, β -FNA 2.5 + aCSF). El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas para el factor tratamiento [$F(1,25)= 4.594$; $p= 0.042$] y para la interacción pretratamiento x tratamiento [$F(1,25)= 5.103$; $p= 0.033$], pero no para el factor pretratamiento [$F(1,25)= 1.972$; $p= 0.173$]. El análisis estadístico posterior de comparación múltiple, mostró que la distancia media recorrida por los animales tratados con aCSF no difirió entre ambos pretratamientos ($p= 0.542$), indicando que **el pretratamiento con β -FNA (2.5 nmoles) no modificó la actividad basal de los animales**. Además, la distancia media recorrida por los animales pretratados con aCSF no difirió entre los tratamientos ($p= 0.932$), volviendo a confirmar la **ausencia de efecto de la dosis de 35 nmoles de etanol *per se*, administrada por vía intra-VTA, sobre la actividad motora de los animales**. Sin embargo, cuando el pretratamiento fue β -FNA, los animales tratados con etanol presentaron una actividad significativamente inferior a la obtenida en los animales tratados con aCSF ($p= 0.007$), e inferior a la registrada en los animales pretratados con aCSF, cuando el tratamiento en ambos grupos fue el etanol ($p= 0.018$), sugiriendo la aparición de **depresión motora en el grupo β -FNA 2.5 + EtOH 35**.

Resultados

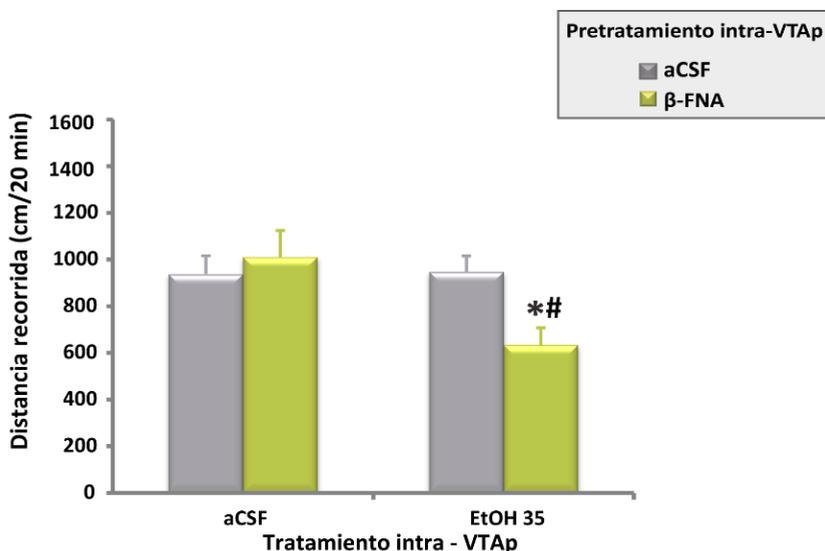


Figura 5.14. Efecto del bloqueo de los MORs en la actividad locomotora de las ratas tras la administración intra-VTAp de 35 nmoles de etanol. La distancia recorrida, expresada en cm, durante los 20 min de la sesión experimental por los animales pretratados con aCSF o 2.5 nmoles de β-FNA (β-FNA 2.5), 24 horas antes de la administración intra-VTAp de aCSF o 35 nmoles de etanol (EtOH 35), se muestran como media ± EE (n= 6-8 animales/ grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo pretratado con aCSF (* p<0.05). La almohadilla denota diferencias significativas respecto a los animales tratados con aCSF (# p≤0.01).

Estos datos ponen de manifiesto que **el bloqueo de los MORs con el antagonista irreversible β-FNA**, es capaz de suprimir, de forma eficiente y selectiva, los efectos excitatorios del etanol sin aparentemente afectar a los efectos depresores de la fracción no metabolizada.

5.1.4. Experimento 6: Estudio de la participación de los receptores GABA_A en la inhibición de la conducta exploratoria tras la administración de etanol

Experimento 6A: Estudio de la administración intra-VTAp de bicuculina sobre la actividad motora: Selección de dosis

- **Validación histológica**

Finalizado el análisis histológico, 34 animales mostraron un correcto posicionamiento de la cánula en el VTAp (*Figura 5.15*) y por tanto, fueron incluidos en el análisis de este experimento. Tan solo 1 animal perteneciente al grupo BIC 70 pmoles fue descartado por el posicionamiento inadecuado de la cánula.

Resultados

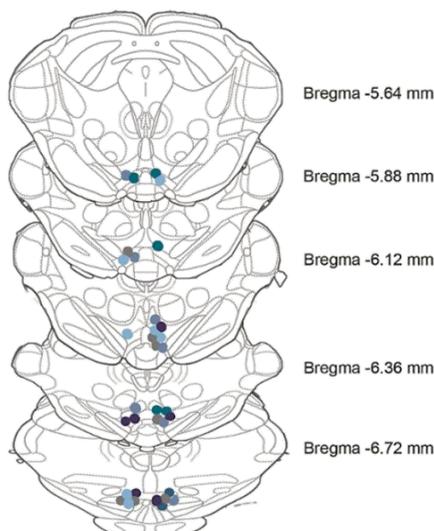


Figura 5.15. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 6A. Los grupos experimentales son: BIC 0 (gris), BIC 8.75 (azul pastel), BIC 17.5 (azul claro), BIC 35 (azul) y BIC 70 (azul oscuro). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

Como puede observarse en la *Figura 5.16*, la **administración intra-VTAp de BIC modificó, de forma dosis-dependiente, la actividad motora de las ratas**. El análisis estadístico detectó diferencias significativas entre los grupos analizados [$F(4,29) = 7.737$; $p < 0.001$]. La prueba de Dunnett evidenció un incremento significativo de la distancia total recorrida en los grupos administrados con las dosis de 35 pmoles ($p = 0.025$) y 70 pmoles ($p = 0.006$) de BIC, respecto a la observada en los grupos que recibieron aCSF (0 pmoles).

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para las dosis de 8.75 pmoles ($p= 0.796$) ni 17.5 pmoles ($p= 0.995$).

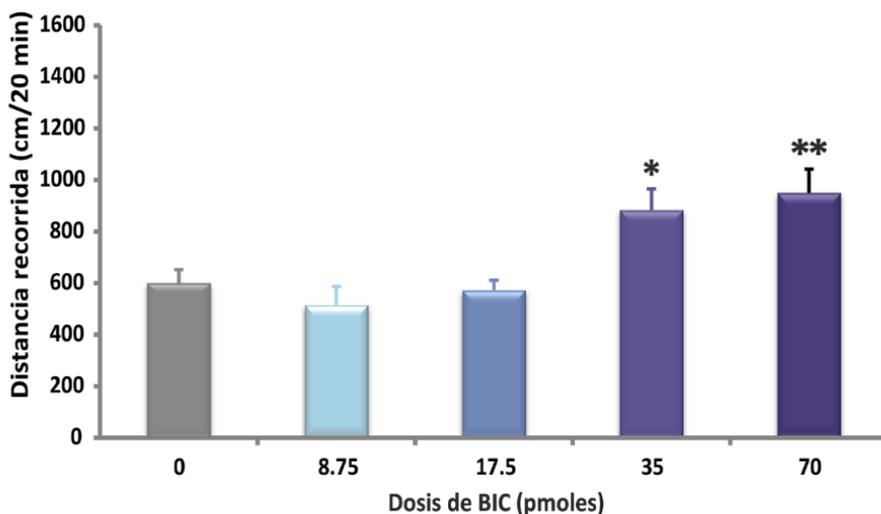


Figura 5.16. Selección de la dosis de bicuculina. Los datos se muestran como media \pm EE y representan la distancia recorrida, expresada en cm, en 20 minutos por los animales tras la administración intra-VTAp de diferentes dosis de BIC (0, 8.75, 17.5, 35 y 70 pmoles) ($n=6-7$ /grupo). El asterisco indica diferencias significativas respecto al grupo control tratado con aCSF (dosis 0 pmoles) (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

A tenor de los resultados, **se seleccionó la dosis de 17.5 pmoles de BIC para realizar el experimento 6B**, ya que fue la **mayor dosis ensayada que no alteró la actividad basal de los animales.**

Resultados

Experimento 6B: Efectos del bloqueo de los receptores GABA_A en la actividad motora, tras la administración de una dosis baja de etanol en diferentes condiciones experimentales

- **Validación histológica**

Finalizada la evaluación histológica de los cerebros de los animales empleados en este experimento, 5 animales fueron desestimados: 1 perteneciente al grupo salino + aCSF + aCSF, 1 del grupo salino + BIC 17.5 + aCSF, 1 del grupo DP 50 + aCSF + EtOH 35, 1 del grupo DP 50 + BIC 17.5 + aCSF y 1 del grupo DP 50 + BIC 17.5 + EtOH 35. En la *Figura 5.17* se muestra la posición de la cánula de los 59 animales finalmente incluidos en el experimento.

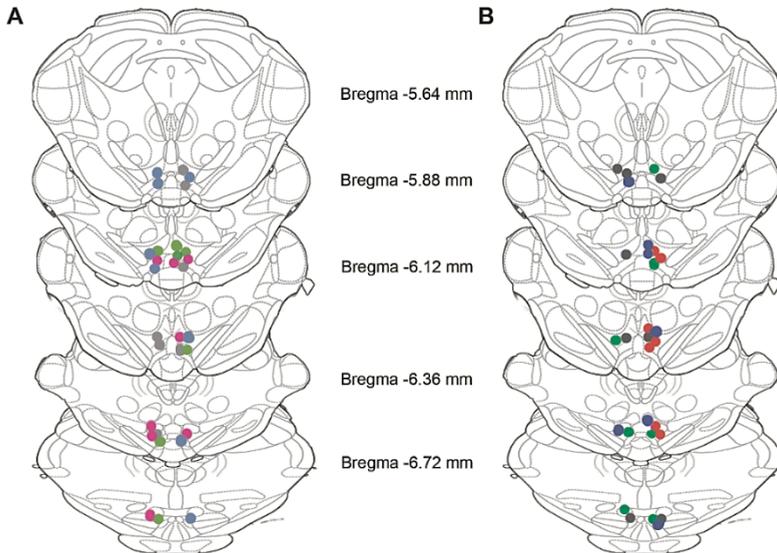


Figura 5.17. Esquemas de las secciones coronales del cerebro de rata en los que se indica, mediante círculos de diferente color (según el grupo experimental), la posición del extremo distal de los inyectores en VTAp en los animales del experimento 6B. En el panel A se muestran los animales cuyo **pretratamiento 1** fue salino, siendo los grupos experimentales: aCSF + aCSF (gris claro), aCSF + EtOH 35 (rosa), BIC 17.5 + aCSF (verde claro) y BIC 17.5 + EtOH 35 (azul claro). En el **panel B** se muestran los animales cuyo **pretratamiento 1** fue DP 50, según la siguiente distribución: aCSF + aCSF (gris oscuro), aCSF + EtOH 35 (rojo), BIC 17.5 + aCSF (verde oscuro) y BIC 17.5 + EtOH 35 (azul oscuro). Los números indican la distancia antero-posterior al punto bregma. Adaptado de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson 2007).

- **Análisis de la actividad locomotora**

Este experimento se diseñó para estudiar si el pretratamiento con BIC (17.5 pmoles) era capaz de: (i) aumentar la actividad motora de los animales tratados con una dosis inactiva de etanol (35 nmoles) y (ii) prevenir la

Resultados

depresión motora inducida por el etanol cuando el ACD es secuestrado (DP 50).

En la *Figura 5.18* puede observarse la distancia media recorrida por los diferentes grupos experimentales en función de los pretratamientos y tratamiento recibidos. El ANOVA de tres vías (2x2x2) reveló diferencias estadísticamente significativas para el factor pretratamiento 1 (salino/DP 50) [F(1,51)= 7.331; p= 0.009], pretratamiento 2 (aCSF/BIC 17.5) [F(1,51)= 6.174; p= 0.016] y para las interacciones pretratamiento 1 x tratamiento (aCSF/EtOH 35) [F(1,51)= 8.944; p= 0.004] y pretratamiento 2 x tratamiento [F(1,51)= 8.482; p= 0.005]. El análisis posterior confirmó que:

- (i) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol fue significativamente diferente entre los animales pretratados con salino + BIC 17.5 y los animales pretratados con salino + aCSF (p= 0.004), mostrando mayor actividad los animales pretratados con BIC,
- (ii) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol fue significativamente diferente entre los animales pretratados con DP 50 + BIC 17.5 y los animales pretratados con DP 50 + aCSF (p= 0.017). En concreto, los animales pretratados con aCSF en lugar del antagonista de los receptores GABA_A, mostraron una reducción en la distancia recorrida,

es decir, las dos hipótesis nulas planteadas: (H₀₋₁) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol no difiere entre el grupo pretratado con salino + BIC y el grupo pretratado con salino + aCSF y, (H₀₋₂) la distancia media recorrida por las ratas tratadas con etanol no difiere entre el grupo

pretratado con DP + BIC y el grupo pretratado con DP + aCSF, fueron rechazadas de acuerdo a la hipótesis de trabajo planteada.

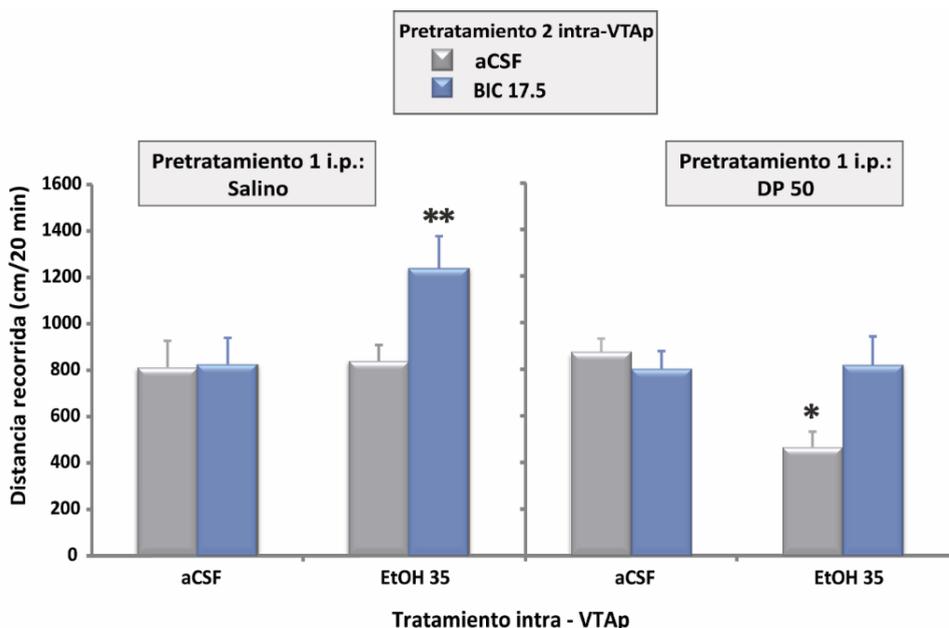


Figura 5.18. Efecto del bloqueo de los receptores GABA_A sobre la actividad locomotora de las ratas derivada de la administración de etanol. Los datos se muestran como media \pm EE y representan la distancia recorrida, expresada en cm, en 20 minutos por los animales pretratados con aCSF o 17.5 pmoles de BIC, mediante microinyección en el VTAp 5 minutos antes del tratamiento con etanol (35 nmoles) o aCSF intra-VTAp (n=7-8/grupo). En la gráfica de la izquierda se representan los resultados obtenidos en los animales **pretratados por vía i.p. con salino** 30 minutos antes de la administración de etanol o aCSF, mientras que en la gráfica de la derecha se muestran los **pretratados i.p. con 50 mg/kg de DP**. El asterisco en la gráfica de la izquierda indica diferencias significativas en la distancia recorrida por los animales tratados con etanol y pretratados con salino + BIC respecto al grupo pretratado con salino + aCSF (**p < 0.01). El asterisco en la gráfica de la derecha indica diferencias significativas en la distancia recorrida por los animales tratados con etanol y pretratados con DP 50 + BIC respecto al grupo pretratado con DP 50 + aCSF (*p < 0.05).

Resultados

Los resultados de este experimento sugieren que **el bloqueo de los receptores GABA_A en el VTAp es capaz de suprimir los efectos motores depresores evocados por el etanol. De ese modo, el antagonista de dichos receptores (BIC) convierte a la dosis de etanol de 35 nmoles en una dosis excitatoria de la actividad motora, cuando no se produce ninguna alteración sobre los niveles de ACD (es decir, cuando las ratas son pretratadas con salino). En cambio, cuando se redujeron los niveles de ACD debido a su secuestro con DP, el pretratamiento con BIC fue capaz de prevenir la depresión motora inducida por la administración de etanol.**

El secuestro del acetaldehído como una nueva estrategia terapéutica para la prevención de la recaída en el alcoholismo

5.2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIRECAÍDA DE LA D-PENICILAMINA: MEDIDA DEL FENÓMENO ADE EN EL MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN OPERANTE

5.2.1. Experimento 1: Evaluación del fenómeno ADE en los animales

Como paso previo a la evaluación, a través del ADE, de la eficacia de la DP para prevenir las recaídas, se comprobó la aparición de dicho fenómeno en nuestras condiciones experimentales.

En la *Figura 5.19* se muestra la evolución temporal de las respuestas, tanto sobre la palanca activa como la inactiva, durante los 10 días (5 de Basal 1 + 5 de Reintroducción 1) del experimento para el conjunto de los animales (n=40). Como puede observarse, **en la Reintroducción 1, los animales mostraron un incremento en las respuestas sobre la palanca activa por encima de lo observado en el periodo Basal 1**. El análisis estadístico (ANOVA de una vía de medidas repetidas) confirmó la existencia de un efecto significativo del factor tiempo [$F(9,351)= 14.35$, $p < 0.0001$] para las respuestas al etanol, lo cual confirma la aparición del fenómeno ADE.

Resultados

Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas [$F(6,226)= 1.376$, $p= 0.227$] para la palanca inactiva.

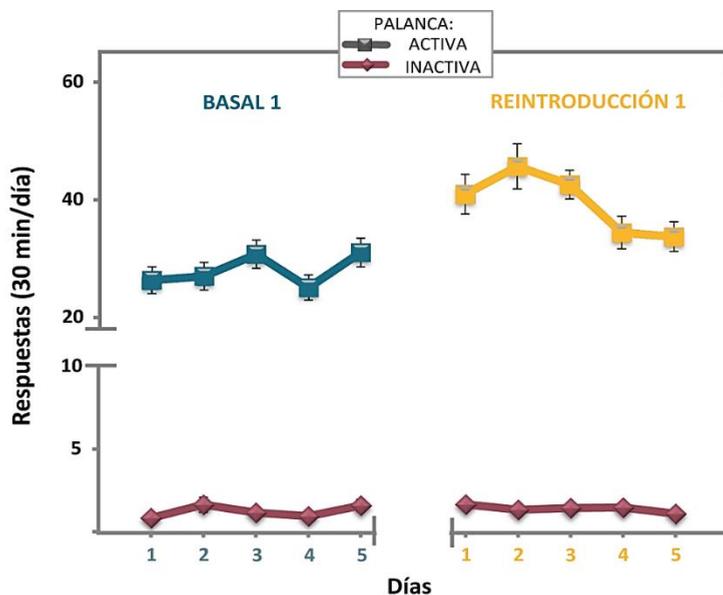


Figura 5.19. Expresión del fenómeno ADE. Los datos se muestran como media \pm EE y representan el número de respuestas sobre las palancas activa e inactiva realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental por los animales incluidos en el experimento ($n=40$), durante los 5 días previos (Basal 1) y los 5 días posteriores (Reintroducción 1) a la primera abstinencia.

Resultados

Para una mejor visualización de los resultados y de la magnitud del fenómeno ADE, en la *Figura 5.20* pueden observarse los valores promedio de las respuestas en la palanca activa e inactiva de los 5 días previos a la fase de privación del alcohol (Basal 1) y los 5 días posteriores al periodo de abstinencia (Reintroducción 1). El análisis estadístico reveló diferencias significativas en las respuestas para la obtención de la solución de etanol al 10 % entre el Basal 1 (28.0 ± 1.0) y la Reintroducción 1 (39.5 ± 1.4) ($p < 0.0001$), confirmando así **la recaída en el consumo de etanol medida como expresión del fenómeno ADE**. En contraste, el periodo de privación no indujo ningún cambio significativo en las respuestas sobre la palanca inactiva ($p = 0.314$).

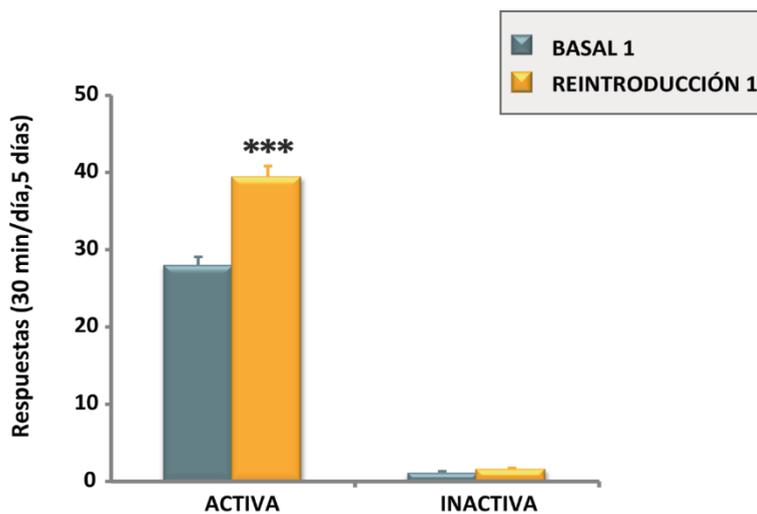


Figura 5.20. Expresión del fenómeno ADE. Los datos se muestran como media \pm EE y representan el promedio de respuestas de la palanca activa e inactiva realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental, durante los 5 días del periodo Basal 1 y del periodo de Reintroducción 1, por los animales incluidos en el experimento ($n=40$). El asterisco indica diferencias significativas respecto a su respectivo periodo basal (***) ($p < 0.001$).

Resultados

5.2.2. Experimento 2: Evaluación de la eficacia antirecaída de la DP tras su administración sistémica

Tras comprobar la expresión del ADE, el siguiente paso fue confirmar la eficacia de la DP para prevenir la recaída alcohólica. A diferencia de los estudios previamente realizados por nuestro grupo de investigación, donde se utilizó el modelo de autoadministración no operante de etanol en el paradigma de las 4 botellas (Orrico *et al*, 2013; 2014a), este ensayo se realizó en un modelo diferente, la autoadministración operante, y en un laboratorio diferente, el Departamento de Psicobiología de la Universidad Complutense de Madrid.

En la *Figura 5.21* se representa, en la parte inferior de cada panel, la evolución temporal de las respuestas para ambas palancas, desde el periodo Basal 2 hasta la Reintroducción 2, periodo durante el cual se administró el tratamiento (DP 0, 6.25, 12.5 y 25 mg/kg) 30 minutos antes del inicio de cada sesión experimental. En la parte superior de cada panel, se muestra el promedio de las respuestas de la palanca activa en los 5 días de Basal 2 y Reintroducción 2, para cada grupo experimental. El análisis estadístico realizado reveló diferencias estadísticamente significativas, a lo largo del tiempo, en las respuestas para etanol del grupo tratado con salino (DP 0), indicando así que **tras el segundo periodo de abstinencia, los animales que no recibieron tratamiento también manifestaron el fenómeno ADE** [$F(9,81)= 1.996$, $p= 0.05$], (cuando las respuestas fueron agrupadas también se detectaron diferencias significativas ($p < 0.001$) (*Figura 5.21A*)). Por contra,

no se detectaron diferencias significativas para las dosis de 6.25 y 12.5 mg/kg de DP, ni a lo largo del tiempo [DP 6.25, $F(3,29)= 2.078$, $p= 0.122$; DP 12.5, $F(7,64)= 1.585$, $p= 0.155$], ni al agrupar las respuestas (DP 6.25, $p= 0.646$; DP 12.5, $p= 0.904$) (*Figura 5.21B y 5.21C*). Sorprendentemente, el análisis mostró una reducción significativa en las respuestas de la palanca activa a lo largo del tiempo [$F(9,81)= 2.731$, $p=0.009$] y al agrupar las respuestas ($p <0.05$), en los animales tratados con la dosis más elevada de DP (25 mg/kg)(*Figura 5.21D*). **Estos datos indican que la DP fue capaz de suprimir la aparición del fenómeno ADE.**

Ni la reintroducción ni el tratamiento indujeron cambios en las respuestas de la palanca inactiva, ya que no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales [DP 0, $F(9,81)= 0.436$, $p= 0.912$; DP 6.25, $F(4,40)= 1.319$, $p= 0.278$; DP 12.5, $F(3,25)= 1.234$, $p= 0.317$; DP 25, $F(4,36)= 0.979$, $p= 0.431$] (*Figura 5.21, parte inferior de cada panel*).

Resultados

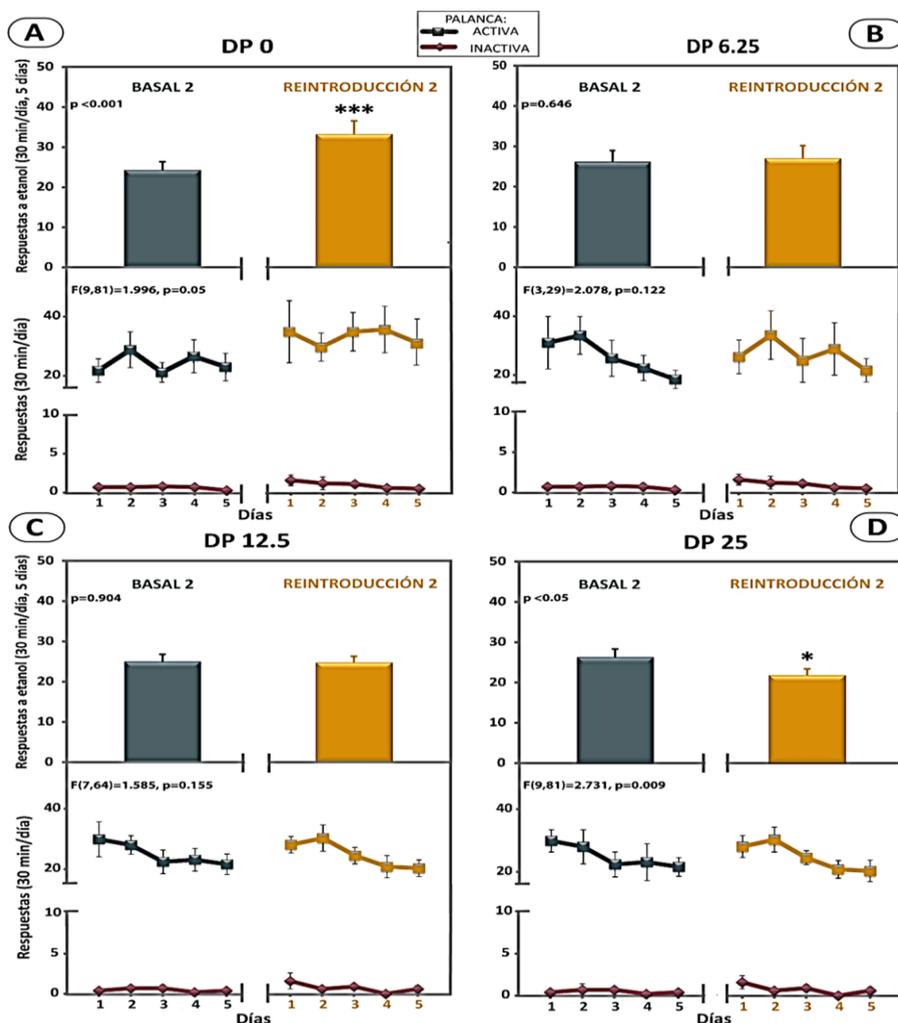


Figura 5.21. Efecto de la DP en la prevención del ADE. Los datos se muestran como media \pm EE y representan, en la parte superior de cada panel, el promedio de respuestas de la palanca activa realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental durante los 5 días del periodo Basal 2 y del periodo de Reintroducción 2; en la parte inferior se representan las respuestas de la palanca activa e inactiva realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental por los animales incluidos en los diferentes grupos experimentales ($n=10$ /grupo). En el panel A se muestran los datos de los animales tratados con salino (DP 0), en el panel B los animales tratados con 6.25 mg/kg de DP (DP 6.25), en el panel C los tratados con 12.5 mg/kg de DP (DP 12.5) y en el panel D los tratados con 25 mg/kg de DP (DP 25); en todos los casos se indican los resultados del análisis estadístico para la palanca activa. El asterisco indica diferencias significativas respecto a su respectivo periodo basal (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$).

Para facilitar la visualización y el análisis de la eficacia de la DP para prevenir la aparición del ADE, se analizaron las respuestas para la obtención del etanol en la Reintroducción 1 y 2 en los mismos grupos de animales. Es decir, los animales se distribuyeron por grupos en el experimento 1 de la misma forma que posteriormente se haría en el experimento 2. Como puede observarse en la *Figura 5.22*, **cuando se compara el promedio de las respuestas de los 5 días Basal 1 y Reintroducción 1, todos los grupos mostraron un incremento en el número de respuestas activas tras la reexposición al alcohol, respecto a sus respectivos periodos basales, manifestando así la aparición del ADE (Figura 5.22A) . Sin embargo, tras la segunda abstinencia, solo los animales tratados con salino (DP 0) mostraron un incremento en las respuestas activas respecto al correspondiente periodo basal. Es decir, el tratamiento con DP bloqueó la aparición del fenómeno ADE (Figura 5.22B).**

Confirmando estas observaciones, el análisis estadístico mostró diferencias significativas en las respuestas a etanol en todos los grupos durante la Reintroducción 1, cuando no se había administrado ningún tratamiento (DP 0, $p < 0.0001$; DP 6.25, $p < 0.0001$; DP 12.5, $p < 0.001$ y DP 25, $p < 0.01$) (*Figura 5.22A*). No obstante, tras la Abstinencia 2, solo el grupo tratado con salino (DP 0) incrementó significativamente las respuestas de la palanca activa durante la Reintroducción 2 (de 24.3 ± 2.1 a 33.3 ± 3.3), indicando la aparición del ADE ($p < 0.001$). En los grupos tratados con 6.25 y 12.5 mg/kg de DP, no se detectaron diferencias significativas entre el periodo Basal 2 (26.2 ± 2.7 y 25.0 ± 1.8 , respectivamente) y la Reintroducción 2 (27.1 ± 3.1 y 24.8 ± 1.5 , respectivamente), sugiriendo que no se manifestó el

Resultados

fenómeno ADE (DP 6.25, $p= 0.646$ y DP 12.5, $p= 0.904$). En los animales tratados con la dosis de 25 mg/kg durante la Reintroducción 2, las respuestas a etanol se redujeron de forma significativa respecto a su valor basal (de 26.3 ± 2.0 a 21.8 ± 1.5) ($p < 0.05$) (*Figura 5.22B*).

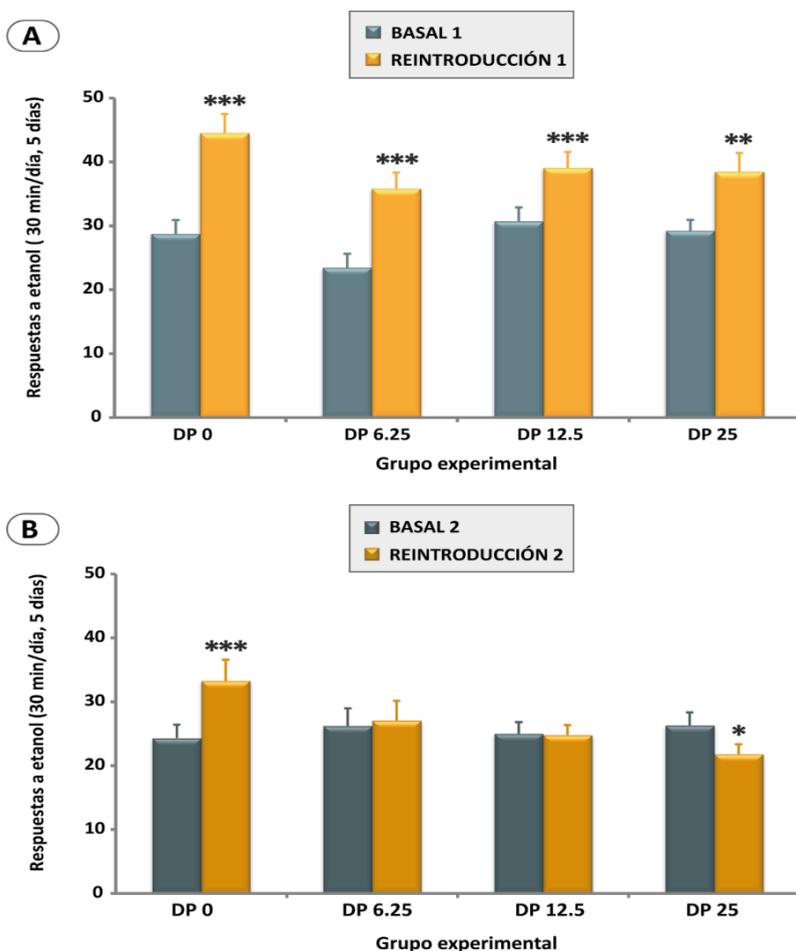


Figura 5.22. Efecto de la DP en la prevención del ADE. Los datos se muestran como media \pm EE y representan el promedio de respuestas a etanol (palanca activa) realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental durante los 5 días del periodo basal y del periodo de reintroducción, para los mismos grupos de animales en el experimento 1 y 2 ($n=10/\text{grupo}$). En el **panel A** se muestran los datos del periodo **Basal 1 y Reintroducción 1**, cuando los animales se agruparon del mismo modo que en el experimento 2, aunque no se les administró ningún tratamiento. El asterisco indica diferencias significativas respecto a su respectivo periodo basal (***) $p < 0.001$; **) $p < 0.01$). En el **panel B** se muestran los datos del periodo **Basal 2 y la Reintroducción 2**, en la cual se administró salino o DP (6.25, 12.5, 25 mg/kg) 30 minutos antes del inicio de cada sesión experimental. El asterisco indica diferencias significativas respecto a su respectivo periodo basal (***) $p < 0.001$; *) $p < 0.05$).

Resultados

La comparación de las respuestas promedio sobre la palanca inactiva en los 5 días del periodo Basal 2 y de la Reintroducción 2, no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos experimentales (DP 0, $p= 0.737$; DP 6.25, $p= 0.104$; DP 12.5, $p= 0.298$ y DP 25, $p= 0.434$) (Figura 5.23).

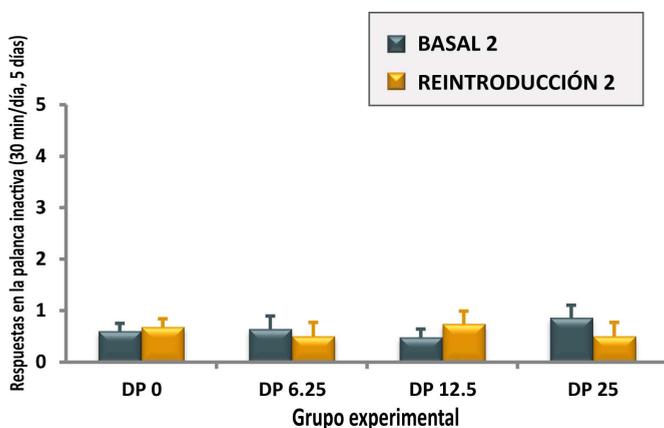


Figura 5.23. Efecto de la reintroducción y el tratamiento con DP en las respuestas de la palanca inactiva. Los datos se muestran como media \pm EE y representan el promedio de respuestas a etanol realizadas en los 30 minutos de cada sesión experimental durante los 5 días del periodo Basal 2 y del periodo de Reintroducción 2, por los animales incluidos en el experimento ($n=10$ /grupo).

5.2.3. Experimento 3: Efectos de la DP y la autoadministración de etanol en la actividad locomotora

Para descartar que los resultados obtenidos en el experimento 2 fueran debidos a una depresión motora inducida por la DP, se analizó la actividad locomotora de los animales tratados con la dosis más alta de DP empleada en el experimento 2 (25 mg/kg).

La inspección de la *Figura 5.24* revela que el tratamiento (DP 25) no alteró la actividad de los animales en comparación al grupo control (DP 0) tratado con salino. El análisis estadístico confirmó que el tratamiento no modificó la actividad horizontal ($p= 0.781$) (*Figura 5.24A*), el número de veces que el animal se levantó sobre las patas traseras (plantadas) ($p= 0.938$) (*Figura 5.24B*), ni la actividad total ($p= 0.934$) (*Figura 5.24C*) de las ratas respecto al grupo control. Por tanto, **la disminución de las respuestas al etanol observada en el experimento 2 no puede atribuirse a una depresión motora derivada del tratamiento.**

Resultados

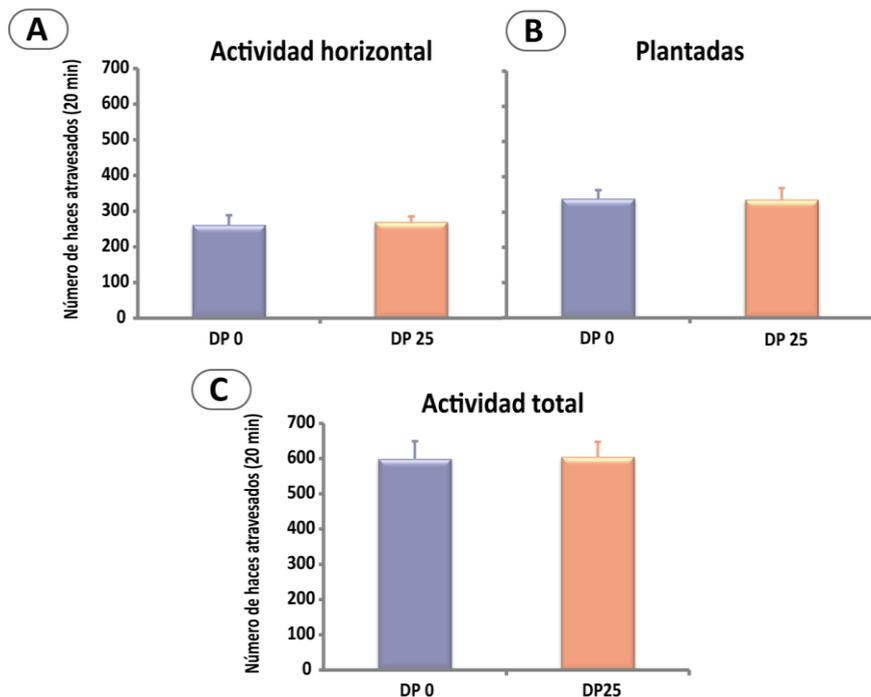
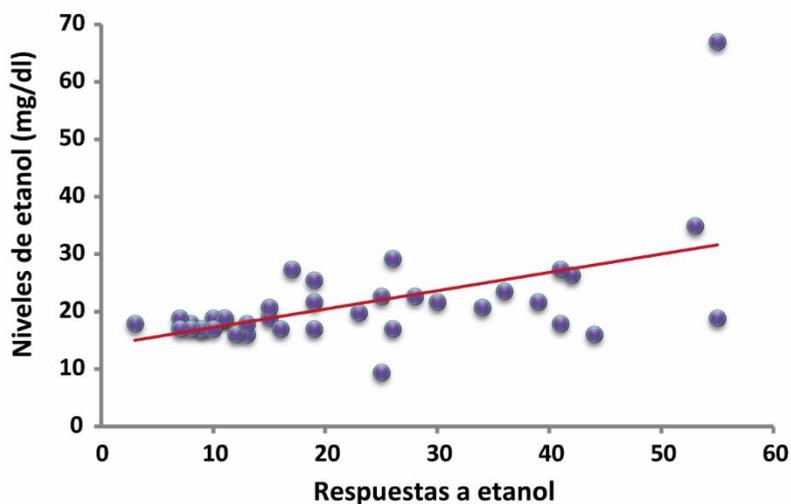


Figura 5.24. Efecto de la autoadministración de etanol y el tratamiento con DP sobre la actividad motora de las ratas. Los datos se muestran como $\text{media} \pm \text{EE}$ y representan el promedio del número de haces infrarrojos atravesados, en los 20 minutos del ensayo, por los animales tratados 30 minutos antes del inicio de la sesión de autoadministración con salino (DP 0) o 25 mg/kg de DP (DP 25) ($n=10/\text{grupo}$). En el **panel A** se muestran los datos de la **actividad horizontal**, en el **panel B** los datos referentes a las **plantadas** y en **panel C** la **actividad total** (sumatorio de la actividad horizontal y las plantadas) de los animales.

5.2.4. Experimento 4: Determinación de los niveles de etanol en plasma

Como validación interna, se analizó la correlación entre las respuestas ejecutadas por el animal y los niveles de etanol presentes en plasma (Figura 5.25). El análisis reveló la existencia de una correlación lineal significativa entre ambos parámetros (Pearson $r= 0.534$; $p < 0.001$), sugiriendo que el etanol liberado en el receptáculo era consumido.



6. DISCUSSION

Globally, the results presented in this Thesis highlight the involvement of both, the brain-generated metabolites and the non-biotransformed fraction of ethanol in the neurobiological effects of this drug. On the one hand, compounds generated from ethanol in the brain, acetaldehyde (ACD) and/or its derivative salsolinol (SAL), seem to be the key elements for triggering the excitation of the ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons (DA neurons) after intra-posterior VTA (pVTA) ethanol administration. On the other hand, ethanol is also able to reduce simultaneously the activity of these neurons through a mechanism dependent on the ethanol non-metabolized fraction. Hence, the behavioural result observed after intra-pVTA administration of ethanol will depend on which of the two mechanisms predominate after administration of the drug, i.e. finally it will depend on the administered dose.

Furthermore, assuming the crucial role of ethanol metabolites in the reinforcing properties of this drug, the preclinical results reported in this Thesis give additional support to our previous data showing that D-Penicillamine (DP), an ACD scavenging agent, could be a promising drug for preventing ethanol relapse.

Neurobehavioural effects of ethanol in the mesolimbic dopamine system

6.1. INVOLVEMENT OF THE BRAIN-GENERATED ACETALDEHYDE IN THE BEHAVIOURAL ACTIVATING EFFECTS EVOKED BY ETHANOL

The participation of ACD in the reinforcing properties and behavioural consequences of ethanol has been a matter of debate for years (Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013c; Israel *et al*, 2015; Neuroactive metabolites of ethanol 2014). Given that ACD levels within the periphery are associated with aversive effects (i.e. flushing, headaches, increased heart rate, etc.) (Chao 1995; Hald and Jacobsen 1948), one of the main issues addressed in the past was if ACD could reach the brain after ethanol administration. In this sense, a common recurrent question has been the following: could ACD cross the blood-brain barrier? If not, could ACD be generated in the brain? Although results reporting detection of ACD in the brain after ethanol administration are controversial (Eriksson and Sippel 1977; Jamal *et al*, 2007; Peana *et al*, 2010a; Sippel 1974), the finding that ethanol can be directly metabolized in the brain, mainly by catalase (CAT) and cytochrome P-4502E1 (CYP2E1) (Aragon *et al*, 1992; Cohen *et al*, 1980; Gill *et al*, 1992; Zimatkin *et al*, 2006), answered the first prerequisite to further explore the role of this metabolite in the ethanol effects.

In this way, the role of the ethanol-derived ACD in the activating effects evoked by ethanol was studied in **experiment 1**. Results of **experiment 1A** showed that **ethanol, intra-pVTA administered, induced a significant increase in the locomotor activity of rats** (*Figure 5.2*). Previous reported studies have demonstrated that ethanol effects on the locomotor activity of rats depend highly on the route of administration employed. The majority of the studies has shown a decrease in the locomotor activity of rats after systemic administration of ethanol (Chuck *et al*, 2006; Correa *et al*, 2003a; Duncan and Cook 1981; Frye and Breese 1981; Masur *et al*, 1986), with only some exceptions reported in studies employing ethanol-preferred line rats (Colombo *et al*, 1998; Paivarinta and Korpi 1993; Rodd *et al*, 2004a). On the contrary, when ethanol is intracerebrally administered, a dose-dependent increase in the motor activity of rats is observed (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006; Correa *et al*, 2003b; Sanchez-Catalan *et al*, 2009). In relation to the latter issue, it is well known that the mesolimbic dopamine system (MCLD system) is implicated in the rewarding properties of both natural and artificial rewards, including ethanol (Ikemoto and Bonci 2014; Koob *et al*, 1998; Weiss *et al*, 1993; Wise and Bozarth 1987). Hence, the activation of DA neurons located in VTA subsequent to the drug administration, is an essential step in the reward signalling. This activation has been positively correlated with heightened motor activity, considering this phenomenon as a **behavioural index that reflects quite accurately the state of activation of VTA DA neurons** (Cornish and Kalivas 2001; Devine and Wise 1994; Gatto *et al*, 1994; Ikemoto 2007; Pankseep 1998; Phillips and Shen 1996; Vezina 1993; Wise and Bozarth 1987). Consequently, authors have widely used the modulation of locomotor behaviour as a measure of the ethanol effects on DA neurons

Discussion

activity (Arizzi-LaFrance *et al*, 2006; Correa *et al*, 2003a; 2003b; Sanchez-Catalan *et al*, 2009; Sanchis-Segura *et al*, 2005).

According to the results obtained in **experiment 1A**, the ACD sequestering agent, DP (Cohen *et al*, 2000; Nagasawa *et al*, 1980), is able to abolish the motor activation induced by intra-pVTA ethanol, without reducing *per se* the motor activity of the animals (*Figure 5.2*). This result suggests that **ACD, locally generated in the pVTA, is responsible for the locomotor activation induced by ethanol in rats**. On the other hand, it is important to realize that the design of this experiment, which combines the systemic administration of DP with the intracerebral administration of ethanol, has been crucial to achieve this conclusion. In fact, most of the studies focused on exploring the role of ACD in the behavioural effects of ethanol (for review see Correa *et al*, 2012) have used the systemic route to administer not only the compounds aimed to modify the activity of the ethanol metabolizing system (Hipolito *et al*, 2007) or either ACD sequestering agents (Correa *et al*, 2008; Font *et al*, 2005; Peana *et al*, 2009), but also ethanol. This design has been very useful to demonstrate the involvement of ACD in the behavioural effects of ethanol, but it was clearly inadequate to show the origin of the ACD involved in these effects. The study by Sanchís-Segura and colleagues (Sanchis-Segura *et al*, 2005) was the first, according to our knowledge, that combined the local inhibition of ACD production with the systemic ethanol administration. In a similar line, the present study (systemic DP administration combined with intra-pVTA ethanol administration) allows us to certify the brain origin of the ACD, as commented above.

On the other hand, a relevant issue to support our conclusion is the existence of the ethanol metabolizing system in the brain. **The VTA, as occurs with other brain structures, has the enzymatic machinery necessary to convert ethanol into ACD.** In fact, several studies have shown that this brain area expresses the enzymes CAT and CYP2E1, the main ethanol-metabolizing systems in the brain (Hipolito *et al*, 2007; Sanchez-Catalan *et al*, 2008; Zimatkin *et al*, 1998). Therefore, it is feasible, from a biochemical point of view, that **ethanol microinjected into the pVTA may be locally converted into ACD.**

Consequently, present findings confirm the excitatory role that ACD, derived from the local ethanol biotransformation, plays in the behavioural effects of ethanol (Correa *et al*, 2012; Deitrich 2004; Quertemont and Tambour 2004). Neurochemical studies also support this observation. Thus, some papers have confirmed the ability of ACD to excite the neuronal activity of VTA DA neurons, showing that systemic (Enrico *et al*, 2009; Foddai *et al*, 2004; Melis *et al*, 2007) or intra-VTA administration of ACD increases the extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens (NAc) (Hipolito *et al*, 2008), an effect clearly indicative of the excitation of DA mesoaccumbens neurons. Interestingly, this activation can be suppressed by pre-treatment with ACD sequestering agents (Enrico *et al*, 2009; Sirca *et al*, 2011), an important result that gives neurochemical support to the present behavioural data. The issue relative to the possible mechanism, at the neurobiological level, will be addressed later, in the epigraph 6.3 of the Discussion.

Discussion

Furthermore, results from **experiment 1B** clearly show that 50 mg/kg of DP did not alter DAMGO-induced locomotion (*Figure 5.4*). These results suggest a clear **specificity of DP effects**. Font and colleagues (Font *et al*, 2005) also showed that DP specifically modified the effect of ethanol on locomotion without affecting the cocaine- or caffeine-induced locomotion. Thus, present data using intra-pVTA administration of DAMGO seem to corroborate the results of the previous study on the specificity of the DP actions.

Finally, we would like to highlight an intriguing tendency observed in **experiment 1A**. According to our working hypothesis, ACD generated in the VTA is responsible for the motor stimulating effects of ethanol. Therefore, the sequestration of this metabolite should be able to reduce or completely prevent the locomotor activation derived from the intra-pVTA administration of ethanol. Theoretically, higher DP plasma levels should lead to lower ACD levels in the pVTA and, consequently, to lower motor activation. In fact, it was observed that as the dose of DP was increased, the ethanol-derived activation was reduced and, finally, abolished. However, a striking tendency was observed when rats were treated with the highest DP dose (50 mg/kg) used in these experiments and ethanol (*Figure 5.2*). In these rats, the distance travelled after ethanol microinjection tended to be lower than that obtained in the respective control group. That is, intra-pVTA ethanol seemed to exert a depressant effect in these animals. Although the statistical analysis did not confirm this tendency, this result established the initial point for the subsequent experiments.

6.2. DOES ETHANOL HAVE A DUAL EFFECT ON THE VTA DOPAMINE NEURON ACTIVITY?

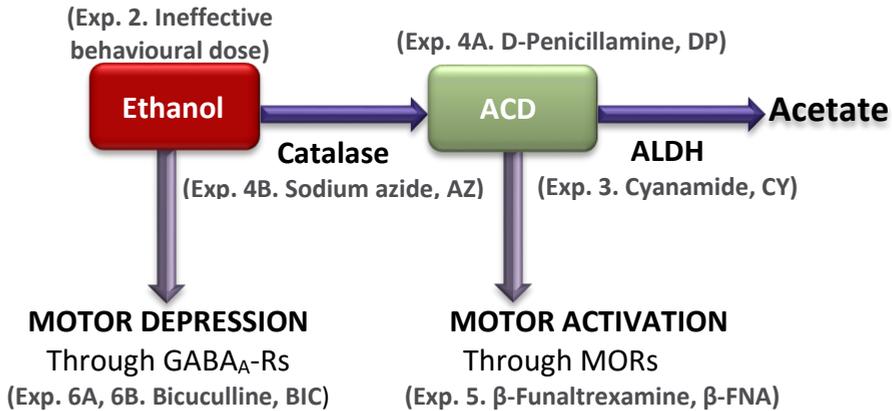
The tendency to motor depression observed in **experiment 1A** (*Figure 5.2*) seems to be in agreement with the literature suggesting that, **ethanol simultaneously exerts opposite effects on the activity of DA neurons in the VTA** (Theile *et al*, 2008; 2009; 2011; Xiao *et al*, 2007; Xiao and Ye 2008). Thus, the possible behavioural implications of this finding were explored in detail in the second series of experiments of this Thesis (**experiments 2, 3 and 4**). Furthermore, a plausible mechanistic hypothesis was studied (**experiments 5 and 6**).

The aim of each performed experiment (from 2 to 6), as well as a summary of the results obtained, are illustrated in the *Figure 6.1*. As shown in this figure, according to our hypothesis, the intra-pVTA administration of ethanol could give rise to two simultaneous and opposing effects on rats motor behaviour. When administering low doses of ethanol, for instance, 35 nmol in this Thesis, no behavioural changes are observed since, probably, the opposed effects tend to offset each other (**experiment 2**, *Figure 5.6*). At first, this lack of effects could be considered a logical result, compatible with the U inverted-shape of the dose-response curve for ethanol (Pohorecky 1977), and attributable to the existence of very low ethanol levels in the brain region studied. Nevertheless, global data obtained in these experiments showed that this explanation could be flawed. The use of appropriate pharmacological tools makes it possible to analyse separately the two opposed effects. The first of these two effects results in an increase in motor

Discussion

activity, probably mediated by the products resulting from the brain ethanol metabolism (ACD and/or SAL), acting through μ -opioid receptors (MORs). The second one, of inhibitory consequences, is produced by the non-metabolized fraction of the administered ethanol, acting through GABA_A-Rs. These results might represent the behavioural reflection of electrophysiological findings suggesting that ethanol dually modulates the GABAergic synaptic transmission onto VTA DA neurons and, consequently, the level of excitation of DA neurons.

In the next section, the ethanol dual effect will be discussed.



Experiment	Pre-treatment (Route of administration)	Aim of the experiment	Motor activity results
2	-	Select an inactive EtOH dose	No effect
3	CY(i.p.)	Inhibit ALDH: ↑ACD levels	Activation
4A	DP(i.p.)	Sequester ACD: ↓ACD levels	Depression
4B	AZ(i.p.)	Inhibit CAT: ↓ACD levels	Depression
5	β-FNA(intra-pVTA)	Block MORs	Depression
6A	-	Select the dose of BIC	No effect
6B	Saline(i.p.) + BIC(intra-pVTA)	Block GABA _A -Rs	Activation
	DP(i.p.) + BIC(intra-pVTA)	Sequester ACD and block GABA _A -Rs	No effect

Figure 6.1. Schematic diagram illustrating the working hypothesis on the opposite motor responses elicited by ethanol in the pVTA, and summary of the results obtained. After intra-pVTA ethanol administration, CAT (and CYP2E1 in minor proportion) metabolizes part of the administered dose into ACD which is, in turn, converted into acetate by the enzyme ALDH. The non-metabolized fraction of ethanol would be responsible for the reduction of the motor activity, whereas ACD would be responsible for the motor activation. For certain doses (35 nmol, **experiment 2**) the effects derived from the non-metabolized fraction of ethanol are offset by those produced by ACD and, therefore, no alteration of the motor activity is observed. For this inactive dose of ethanol, the increase of local ACD levels by blocking ALDH with CY (**experiment 3**) caused motor activation. On the other hand, the reduction of local ACD levels by sequestration of ACD with DP (**experiment 4A**) or inhibition of CAT with AZ (**experiment 4B**) resulted in motor depression. In the effects elicited by ACD, MORs seem to be implicated given that the blockade of these receptors with β-FNA suppress the activating effect of ethanol unmasking the motor depression (**experiment 5**). The effects produced by the non-metabolized fraction of ethanol seem to be mediated through GABA_A-Rs since the intra-pVTA administration of 17.5 pmol (a dose without effect on the motor activity, **experiment 6A**) was able: i) to increase the motor activity in animals receiving 35 nmol of ethanol and ii) to prevent the motor depression produced by the reduction of ACD levels with DP (**experiment 6B**).

6.3. THE DUAL ACTION OF ETHANOL ON THE VTA DOPAMINE NEURON ACTIVITY

- **Excitatory effects of ethanol**

Although the biological basis of the reinforcing properties of ethanol has not been completely elucidated, it is well known that, like other drugs of abuse, the MCLD system has to be involved (Ikemoto 2010; Nestler 2001). **The administration of ethanol directly into the pVTA induces excitation of VTA DA neurons *in vitro*** (Brodie *et al*, 1990; Brodie *et al*, 1999b; Melis *et al*, 2009; Xiao *et al*, 2007), as well as *in vivo* (Foddai *et al*, 2004; Gessa *et al*, 1985; Mereu and Gessa 1984), triggering, as a consequence, an increase in the DA release into the NAc shell (Di Chiara and Imperato 1988; Gonzales *et al*, 2004; Howard *et al*, 2008; Imperato and Di Chiara 1986). The stimulation of the DA transmission in the NAc is also observed after intraperitoneal (i.p.) (Imperato and Di Chiara 1986), intragastric (i.g.) (Enrico *et al*, 2009) and intravenous ethanol administration (Howard *et al*, 2008), and as commented previously, this activation has been correlated with increases in animals exploring activity. Nevertheless, some questions remain unanswered, e.g., **which is the responsible for this activation, ethanol itself or its derivatives?**

As a result of several studies trying to shed some light on this issue, different theories have emerged. One of them, points to ethanol itself as the only compound causing its reinforcing properties (Eriksson *et al*, 1980; Sippel 1974; Tabakoff *et al*, 1976). However, opposing theories suggest that ethanol is only a 'pro-drug' and its effects are dependent on the action of its

metabolites/derivatives (Karahanian *et al*, 2011; Raskin 1975; Truitt and Walsh 1971). Less extreme theory, and maybe the most accepted one among researches working on this topic, postulates that both ethanol and its by-products, acting jointly, would be accountable for the ethanol rewarding properties (Deehan *et al*, 2013a; 2013c; Israel *et al*, 2015). In this sense, the role of ACD in the excitation of VTA DA neurons after ethanol administration has been the subject of intense research along several decades (Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013c; Muggironi *et al*, 2013; Peana and Acquas 2013).

Part of the data showed in this Thesis represents a new step on the road to prove **the involvement of ethanol metabolites in the ethanol-evoked excitation of VTA DA neurons**. Results of **experiment 3** showed that after inhibition of ALDH (the enzyme responsible for the ACD metabolism) by CY, the 35 nmol dose of ethanol (a dose initially inactive from the standpoint of motor activity, *Figure 5.6*), becomes excitatory (*Figure 5.8*). This finding suggests that the greater accumulation of ACD in the VTA of animals pre-treated with CY would tip the scales in favour of motor excitation. It should be mentioned that although some studies (DeMaster *et al*, 1985; Sanchis-Segura *et al*, 1999b) have proposed an additional effect of CY as inhibitor of CAT (an enzyme with opposite effects on brain ACD concentrations), experimental evidence seems to demonstrate that the effects of CY *in vivo* on ACD concentrations are predominantly due to ALDH inhibition (Jamal *et al*, 2003a; 2003d; 2007; Tambour *et al*, 2007). In fact, in these latter studies it has been shown that pre-treatment with CY at concentrations similar to that used in **experiment 3** provokes a notorious

Discussion

dose-dependent increments in ACD levels, both in blood and brain dialysates.

The result of **experiment 3** is a remarkable finding because, so far, the evidence supporting the involvement of ACD and/or its derivatives in the ethanol activating effects has been mostly obtained, with some relevant exceptions (Correa *et al*, 1999; 2000; 2005; Karahanian *et al*, 2015), from experiments using either the blockade of ACD production (Correa *et al*, 2012; Hipolito *et al*, 2007; Ledesma and Aragon 2012; Ledesma *et al*, 2012; Ledesma and Aragon 2013; Ledesma *et al*, 2014; Peana *et al*, 2013b) or the sequestration of the ACD (Correa *et al*, 2012; Orrico *et al*, 2013; Peana *et al*, 2013a), experiment 1A). Additionally, through electrophysiological approximation, a lack of ethanol-derived excitation of DA neurons has also reported when ethanol metabolism is blocked with inhibitors of either ADH (Foddai *et al*, 2004) or CAT (Diana *et al*, 2008; Melis *et al*, 2007), as much as, when ACD is inactivated (Enrico *et al*, 2009). These more direct studies back up our indirect behavioural evidence, showing the participation of ACD in the ethanol excitatory effects. On the other hand, while these results indicate that ethanol actions on the DA neurons are mediated by ACD, other studies have given account of clear differences in the mechanisms of action of ethanol and ACD (Deehan *et al*, 2013a). Globally, all of these studies strengthen the theory that **ethanol rewarding properties are due to the action of this drug in conjunction with ACD, which constitutes a key component in this process.**

Because of ACD has a short half-life (Correa *et al*, 2012) and is a highly reactive compound, a further step has been studying the involvement of ACD

condensation products with biogenic amines, the so-called tetrahydroisoquinoline alkaloids (THIQs) (Cohen and Collins 1970; Cohen 1976; Davis and Walsh 1970) and tetrahydro-beta-carbolines (TBCs) (Buckholtz 1980). In this sense, SAL, the THIQ formed by condensation of ACD with DA (Collins and Bigdeli 1975; Yamanaka *et al*, 1970), has been the most studied ACD derivative and its role in the neurobiological effects of ethanol has been deeply discussed (Deehan *et al*, 2013c; Hipolito *et al*, 2012). Interestingly, today there is a renewed interest in evaluating the implication of this ethanol by-product (Melis *et al*, 2015; Quintanilla *et al*, 2014; 2015; Xie *et al*, 2012; Xie and Ye 2012; Xie *et al*, 2013). Although the detection of SAL levels in brain subsequent to ethanol administration has resulted controversial (Deehan *et al*, 2013c; Hipolito *et al*, 2012; Lee *et al*, 2010; Melis *et al*, 2015; Quintanilla *et al*, 2014), some positive correlation has been established (Rojkovicova *et al*, 2008; Starkey *et al*, 2006). On the other hand, separate studies have reported that central and peripheral administration of SAL provokes an increase in the ethanol consumption and preference. Moreover, SAL possesses discriminative properties similar to ethanol because animals respond in a similar way when SAL is substituted for ethanol (Duncan and Deitrich 1980; Myers and Melchior 1977; Purvis *et al*, 1980; Quintanilla *et al*, 2014; 2015). Thus, this compound mimics the behavioural and neurobiological effects of ethanol and ACD, in a U-shaped dose–response fashion too, but at lower concentrations, indeed, the reinforcing potency would be SAL > ACD > ethanol. In this way, studies have shown that SAL induces locomotor activation, produces conditioned place preference (CPP) (Hipolito *et al*, 2010; 2011; Matsuzawa *et al*, 2000; Quintanilla *et al*, 2014; 2015), and is self-administered in pVTA

Discussion

(Deehan *et al*, 2013c; Rodd *et al*, 2005; 2008). Additionally, SAL is able to stimulate VTA DA neurons (Melis *et al*, 2015; Xie and Ye 2012; Xie *et al*, 2012) and to increase DA release in NAc shell after intra-pVTA microinjection (Deehan *et al*, 2013b; Hipolito *et al*, 2011). Melis and colleagues (Melis *et al*, 2015) have published the most recent evidence supporting a clear role for SAL in the ethanol rewarding properties. In this *in vitro* study, both ethanol and ACD, but not SAL, failed to stimulate pVTA DA neurons in absence of DA, that is, when mice were pre-treated with either α -methyl-p-tyrosine (an inhibitor of DA synthesis and release) or reserpine (which depletes monoamine vesicular stores by inhibition of vesicular uptake). Furthermore, ethanol-induced excitation of DA neurons requires its oxidation into ACD, since the inhibition of H₂O₂-CAT system by 3-amino-1,2,4-triazole (a CAT inhibitor) or α -lipoic acid (a H₂O₂ scavenger) pre-treatment, prevented ethanol-induced increase in the firing rate of pVTA DA neurons.

The next question would be **how do ethanol by-products induce this activation?**

In spite of decades of research, this issue is still a matter of debate. It has been well documented that **ethanol is able to interact (directly or indirectly) with multiple targets** (i.e. GABAergic, glutamatergic, dopaminergic, opioid, serotonergic, endocannabinoid systems, L-type Ca²⁺channels, MAP kinases, etc.) modulating the neuronal excitability (Erdozain and Callado 2014; Morikawa and Morrisett 2010).

VTA DA neuron activity is under the influence of several neurotransmitter systems, mainly by the glutamatergic and GABAergic

systems. In this sense and according to the literature, ethanol seems to interact primarily with two membrane receptors, GABA_A and NMDA, enhancing the GABA action and antagonizing glutamate (Glu) action, being the net effect of this interplay a depression of the DA neurons (Erdozain and Callado 2014; Morikawa and Morrisett 2010). Hence, these reported results cannot explain, from a mechanistic point of view, the activating effects of ethanol.

Some authors have suggested that ethanol could directly enhance the activity of DA neurons through changes in the hyperpolarization-activated cation current (I_h) (Brodie *et al*, 1990; Brodie and Appel 1998; Brodie *et al*, 1999b; Brodie and Appel 2000; Okamoto *et al*, 2006). However, recent reports demonstrate that this activation needs the presence of ACD (Diana *et al*, 2008; Enrico *et al*, 2009; Foddai *et al*, 2004; Melis *et al*, 2007) or SAL (Melis *et al*, 2015) to be detected.

On the other hand, differences observed in the increases of DA neurons firing between *in vitro* (modest increase) (Brodie *et al*, 1990; Brodie and Appel 1998; Brodie *et al*, 1999b) and *in vivo* (Gessa *et al*, 1985; Stobbs *et al*, 2004) studies, suggested that other than a direct mechanism might contribute to the excitatory ethanol actions. Then, an additional mechanism has been proposed. VTA DA neurons are under inhibitory control by GABA neurons (Johnson and North 1992a; Steffensen *et al*, 2006), including those from the rostromedial tegmental nucleus (RMTg)/tail of the VTA (tVTA) (Jalabert *et al*, 2011; Sanchez-Catalan *et al*, 2014), interneurons (Johnson and North 1992b; Luscher and Malenka 2011) and medium spiny neurons (MSN) from NAc and ventral pallidum (VP) (Hjelmstad *et al*, 2013; Kalivas 1993).

Discussion

Consequently, **ethanol or its derivatives could excite indirectly DA neurons by decreasing GABA transmission onto these neurons through interaction with MORs expressed on GABA neurons** (Di Chiara and North 1992; Svingos *et al*, 2001). Electrophysiological studies have evidenced this ethanol indirect excitation of DA activity (Gallegos *et al*, 1999; Guan and Ye 2010; Xiao *et al*, 2007; Xiao *et al*, 2008), supporting neurochemical and behavioural studies that have highlighted the relevance between the opioid system and ethanol (Font *et al*, 2013; Nutt 2014; Oswald and Wand 2004; Samson and Doyle 1985; Volpicelli *et al*, 1992).

Different theories have emerged to explain how ethanol and/or its derivatives interact with MORs. Some authors have proposed the **endogenous peptide β -endorphin** as the responsible for this interaction (Cagniard *et al*, 2006; Piepponen *et al*, 1999; Pierce and Kalivas 1995). This theory is based on the demonstration that ethanol *in vitro* (Gianoulakis 1990; Reddy *et al*, 1995), and systemically administered *in vivo*, is able to induce the release of β -endorphin in the hypothalamic Arcuate nucleus (NArc) (Schulz *et al*, 1980), NAc (Marinelli *et al*, 2004; Olive *et al*, 2001), midbrain including VTA (Jarjour *et al*, 2009; Rasmussen *et al*, 1998) and central amygdala (CeA) (Lam *et al*, 2008). Moreover, it has been shown that lesions of the NArc are sufficient to prevent ethanol behavioural effects (Sanchis-Segura *et al*, 2000). In addition, the NArc is the main site of β -endorphin synthesis in the brain, and curiously, it is one of the areas with higher levels of CAT (Zimatkin and Lindros 1996) and lower of ALDH expression (Zimatkin *et al*, 1992), thereby the involvement of ACD has also been suggested. Indeed, several authors have demonstrated *in vitro* that ethanol-induced

β -endorphin release could be mediated by ACD (Pastorcic *et al*, 1994; Reddy and Sarkar 1993; Reddy *et al*, 1995). Furthermore, Sanchis-Segura and colleagues (Sanchis-Segura *et al*, 2005) showed that direct administration of CAT inhibitors into the NArc was able to prevent ethanol-derived locomotor activation in rats. In a similar way, Pastor and Aragon (Pastor and Aragon 2008) demonstrated that locomotor activation induced by ethanol microinjected into the NArc could be prevented by systemic administration of either CAT or opioid receptor inhibitors. However, although the evidence on the effect of ethanol on β -endorphin release is solid, there are some aspects to consider. For example, there is no evidence showing the release of this peptide after intra-pVTA administration of ethanol or ACD, so this theory could not explain the results of Sanchez-Catalan and colleagues (Sanchez-Catalan *et al*, 2009) in which, ethanol or ACD locally injected into the pVTA, induce an activation of the DA neurons through a mechanism dependent on the MORs. In a similar way, the results obtained in this Thesis could not be explained by this theory. Moreover, there is another relevant point that needs to be considered: other drugs of abuse, like cocaine or amphetamine, also induce β -endorphin release in NAc after systemic administration (Olive *et al*, 2001) indicating that the releasing effect is not exclusive for ethanol.

The alternative hypothesis was firstly established by Davis and Walsh (Davis and Walsh 1970), who discovered the formation *in vivo* of **morphine-like alkaloids (THIQs), among which SAL is included**. Several theories about SAL mechanism of action have been set out (for review see (Hipolito *et al*, 2012)). One of them proposes an enhancement of glutamatergic transmission by **activation of D₁Rs** as the underlying mechanism for SAL

Discussion

action (Xie and Ye 2012; Xie *et al*, 2013). The most studied one, states that SAL would act as a **MORs agonist** triggering DA neurons disinhibition (Critchler *et al*, 1983; Hipolito *et al*, 2008; Matsuzawa *et al*, 2000; Myers *et al*, 1985; Xie *et al*, 2012). Findings supporting the latest assertion are: (i) the structure of SAL is similar to that of morphine (Davis and Walsh 1970); (ii) SAL can bind to opioid receptors and produces opioid-like effects (Fertel *et al*, 1980; Lucchi *et al*, 1982);(iii) as MORs agonists do, after intra-VTA administration SAL shows rewarding properties, such as locomotor activation or CPP which can be blocked by MORs antagonists (Hipolito *et al*, 2010); and (iv) as MORs agonist do, SAL can increase both NAc DA extracellular levels and the firing rate of DA neurons. This enhancement can be suppressed by blocking the MORs (Deehan *et al*, 2013b; Hipolito *et al*, 2011; Xie *et al*, 2012).

This latest theory could explain part of the data obtained in this Thesis. If ethanol activating effects in its dual action onto the DA neuron activity are dependent on the direct interaction of SAL with MORs, located in the soma of VTA GABA neurons, it is supposed that the local and specific blockade of these receptors should selectively suppress the activating component of the ethanol effects. Effectively, in **experiment 5**, the irreversible blockade of MORs by means of β -FNA (intra-pVTA injected) is able to suppress the ethanol excitatory component, theoretically elicited by SAL after ethanol metabolism, unmasking the motor depression derived from the non-biotransformed fraction of ethanol (*Figure 5.14*). One important issue to keep in mind is related to the use of **β -FNA as a MOR antagonist**. It is plausible to assume that an irreversible blockade of MORs could change

baseline activity levels within the VTA and, additionally, induce homeostatic changes to compensate for the persistent MORs blockade (for example, increasing membrane expression of receptors or increasing the local release of other neurotransmitters and modulators). Furthermore, β -FNA has acute agonist properties at the kappa opioid receptor (Ward *et al*, 1982) which also could induce long-lasting changes through kinase pathways in the VTA function, including the GABA function (Graziane *et al*, 2013; Polter *et al*, 2014). Nonetheless, under our experimental conditions, intra-pVTA administration of β -FNA did not modify motor activities in animals of the β -FNA + aCSF group in relation to those observed in the aCSF + aCSF-treated animals (*Figure 5.14*). Similar results were previously reported by works of our group with this compound (Hipolito *et al*, 2010; Sanchez-Catalan *et al*, 2009). All in all, these data allow us to rule out the influence of these non-desired effects of β -FNA on our results.

Discussion

- **Depressant effects of ethanol**

In contrast to the results presented in the previous section, **experiment 4** showed that an **initial ineffective ethanol dose could exert a depressant effect on animal motor behaviour when the ACD levels and, therefore, SAL formation in the pVTA were reduced**, either by chemical inactivation of ACD by means of DP (**experiment 4A, Figure 5.10**) or by the inhibition of CAT after AZ pre-treatment (**experiment 4B, Figure 5.12**). This action could be attributed to the reduction of the ACD and/or SAL-mediated excitatory effects, which would allow unmasking concurrent inhibitory effects of ethanol. Some *in vitro* electrophysiological studies have described this dual action of ethanol and have attributed the inhibitory effect to the enhancement in GABA release onto VTA DA neurons (Theile *et al*, 2008; 2009; 2011; Xiao and Ye 2008). Besides, it has been shown that ethanol potentiates GABA release in many other brain regions, such as the brainstem, basolateral amygdala (BLA), hippocampus and CeA (Criswell *et al*, 2008; Siggins *et al*, 2005; Weiner and Valenzuela 2006).

Results exposed herein are in agreement with the assumption that **ethanol (more specifically, the non-metabolized fraction of ethanol) is able to increase the GABA release from presynaptic terminals** and, consequently, to damp the excitatory effect onto VTA DA neuron activity. We cannot strictly affirm that in animals receiving the AZ pre-treatment (**experiment 4B**) there was an increase in the non-metabolized fraction of ethanol in pVTA relative to that obtained in control animals, given that we did not measure ethanol, ACD or SAL concentrations in the VTA after any pre-treatment. However, it is reasonable to assume, from a pharmacokinetic

point of view, that inhibition of the main brain enzymatic system involved in the biotransformation of ethanol into ACD (Zimatkin *et al*, 2006) should result in a local increase in the ratio ethanol/ACD VTA levels. Similar reasoning could be applied to the pre-treatment with DP (**experiment 4A**), which has shown to reduce efficiently the ACD levels (Cohen *et al*, 2000; Nagasawa *et al*, 1978; 1980; Serrano *et al*, 2007). Thus, theoretically, the effects produced by the non-biotransformed fraction of ethanol should be promoted in AZ and DP pre-treated animals. Conversely, in pre-treated animals, the effects mediated by ACD and/or SAL should be weaker than those observed in control animals because ACD levels in VTA under CAT inhibition or ACD inactivation should be, logically, diminished. Consequently, it can be reasoned that in animals pre-treated with AZ or DP the behavioural effects observed after intra-pVTA administration of 35 nmol of ethanol mainly derive from the non-metabolized fraction of ethanol. On the other hand, we could not rule out the possibility that the depressing effects observed after **blocking the metabolism** of ethanol was the result of a non-desired effect derived from the alteration of the normal balance between ethanol metabolized and non-metabolized. Nevertheless, it is important taking into account that with DP pre-treatment ethanol metabolism is not altered and the motor depression was also observed. Furthermore, the same result was observed when the SAL-derived activation was suppressed by MORs blockade (**experiment 5**), without affecting the normal balance between ethanol metabolites and the non-metabolized fraction.

Discussion

The question regarding the **mechanism underlying this inhibitory action of ethanol is currently unresolved**. Theile and colleagues (Theile *et al*, 2009) have proposed that an increase in Ca^{2+} release, from IP_3 -sensitive stores, due to the **5-HT_{2C} receptor** activation is involved in the ethanol-induced enhancement of VTA-GABA release. Since electrophysiological evidence suggests that the ethanol induced GABA release could reduce, through **GABA_A-Rs**, the activity of VTA DA neurons (Xiao and Ye 2008), we decided to analyse if the behavioural observations of this Thesis could be related to those physiological findings (**experiment 6**). According to this hypothesis, the blockade of GABA_A-Rs in the pVTA should prevent the motor depressant effects elicited by the non-metabolized fraction of ethanol. Furthermore, the intra-pVTA administration of 35 nmol of ethanol in the presence of antagonists of GABA_A-Rs should prevent or attenuate the motor depression in animals in which the ACD levels have been reduced by pre-treatment with DP, but also it should induce motor activation in animals pre-treated with saline. In **experiment 6B**, using a 17.5 pmol dose of BIC (the maximum dose that in our experimental conditions was devoid of significant effects on motor activity, **experiment 6A**, *Figure 5.16*), we were able to demonstrate both predictions (*Figure 5.18*).

The use of BIC as antagonist of the GABA_A-Rs could raise doubts about the selectivity of the observed effects, due to BIC is able to block not only the GABA_A-Rs but also the calcium-sensitive K^+ (SK) channels (Debarbieux *et al*, 1998). Therefore, we must be wary of attributing the effects obtained solely to the GABA_A-Rs blockade. In this regard, some reports have demonstrated that both activators (Vick *et al*, 2010) and blockers of the SK channels

(Steketee and Kalivas 1990) affect motor responses in rodents. Concretely, the intra-VTA administration of the channel blocker apamin is able to evoke significant dose-dependent increases in motor activity in rats through a mechanism partially dependent on DA. Hence, it is reasonable to assume that BIC could be exerting a similar effect on VTA DA neurons in **experiments 6A and B**. Therefore, the ability of BIC to increase the motor activity in rats in the presence of ethanol (*Figure 5.18*, left panel) or to prevent the motor depression in the presence of ethanol and DP (*Figure 5.18*, right panel) could be attributed not only to the blockade of GABA_A-Rs but also the blockade of the SK channels in the VTA DA neurons. Although this possibility exists, there are some controversial points in this reasoning that must be taken into consideration. As observed in *Figure 5.16* and left panel of the *Figure 5.18*, 17.5 pmol of BIC did not affect the motor activity of the animals, i.e., in absence of another excitatory stimulus (such as the ethanol-derived ACD), the blockade of both the GABA_A-Rs and the SK channels did not alter the motor behaviour of the rats. It can be argued, however, that the administration of 35 nmol ethanol (another neutral stimulus from a behavioural point of view) in the presence of BIC results in an effective depolarization of DA neurons as a consequence of the summation of several depolarizing stimuli (all of them ineffective when presented separately). Consequently, the combined action of the ACD and BIC could explain the motor excitation observed on the left panel of *Figure 5.18*. But, when the ACD excitatory influence was eliminated (by DP sequestration, right panel of *Figure 5.18*), BIC was able to revert, *per se*, the ethanol-evoked depression of the motor activity. It is not clear why BIC is now able to increase the motor activity in the absence of ACD. Only the blocking action of BIC on GABA_A-Rs

Discussion

could give mechanistic support to the ethanol-evoked motor depression and its recovery by BIC. Hence, it seems more plausible to assume that the lack of the depressing effects of ethanol in the presence of DP in animals pre-treated with BIC are mainly due to its ability to hinder the interaction of the ethanol-evoked GABA release (suggested in electrophysiological studies) with GABA_A-Rs, although its additional ability to block SK channels cannot be neglected.

CONCLUDING REMARKS

Altogether, the present behavioural data are relevant to disentangle the mechanism of action of ethanol which could present new avenues for the research about alcoholism aetiology and treatment. Nonetheless, we are aware that more direct and detailed experiments are necessary to fully understand this phenomenon. For instance, at present it is not clear if ethanol inhibitor effect on motor activity can be observed with other drug doses, since in electrophysiological studies the ethanol enhancement of GABAergic transmission has been concentration-dependent (Theile *et al*, 2008; 2009). Moreover, VTA cells seem to exhibit regional differences in response to different drugs of abuse, including opioids (Ford *et al*, 2006; Margolis *et al*, 2008; 2012) and ethanol (Mrejeru *et al*, 2015). Consequently, further studies using more precise analysis than the behavioural ones will be necessary to explore the specific role of SAL and the non-biotransformed fraction of ethanol on the activity of the different subpopulation of midbrain neurons in detail.

Acetaldehyde sequestration as a novel therapeutic strategy for preventing alcohol relapse

Alcohol use disorders suppose today a major global health problem (Andlin-Sobocki and Rehm 2005; Kessler 2005), and alcoholic patients, as other drug dependent patients, have an extraordinarily high rate of recidivism for drug use even after long periods of abstinence. Over last decades, a significant progress has been made in the **search of promising pharmacotherapy for alcoholism** (Litten *et al*, 2012) and, although there are several medications currently approved to treat alcoholism, they have important limitations: the effect size is reduced and, globally, compliance by the patient is very low (Rosner *et al*, 2010). Therefore, identifying new pharmacological agents that may be effective in preventing relapse is considered imperative. The main problem about identifying efficient treatments against alcoholism is the **complex mechanism underlying ethanol action** and the awareness about it. Considering the multifactorial nature of ethanol effects, a single medication that targets specific receptors for neurotransmitters and neuromodulators is not expected to lead to successful treatment (Spanagel and Vengeliene 2013). Indeed, many of the most of preclinical promising candidates have been unsuccessful in clinical due to their significant adverse effects on other brain or body functions (Leggio *et al*, 2010; Spanagel and Vengeliene 2013).

6.4. EVALUATION OF THE D-PENICILLAMINE EFFICACY IN ETHANOL RELAPSE-LIKE DRINKING FROM AN OPERANT SELF-ADMINISTRATION PARADIGM

- **Expression of the ADE phenomenon**

Decades of research support the hypothesis that animal models, concretely the rat animal model of alcoholism, constitute an excellent platform for screening and developing pharmacological treatments for this disorder (Belin-Rauscent *et al*, 2015; Bell *et al*, 2012; Bossert *et al*, 2013; Ciccocioppo 2013; Vengeliene *et al*, 2014). Importantly, these models have been used to test medications that are currently approved for alcoholism treatment (Heyser *et al*, 2003; Holter *et al*, 1997; Walker and Koob 2008).

In this sense, several animal models have been developed to study the complexity of the human addicted behaviour, allowing us to evaluate some of its characteristics as, loss of control over drug taking, compulsive drug seeking, impulsivity or relapse (Heyne *et al*, 2000; Spanagel 2000; Spanagel and Holter 2000; Spanagel and Kiefer 2008).

Two main procedures have emerged to assess the **relapse-like behaviour** (one of the differentiating characteristics between drug use and addiction): the reinstatement and the ADE model (Le and Shaham 2002). Although the **reinstatement model** has been useful to evaluate drug seeking and relapse (Rodd *et al*, 2004b; Shaham *et al*, 2003; Spanagel 2003) with **predictive validity** (Bachteler *et al*, 2005; Katner *et al*, 1999), in this procedure the reinstatement is performed under drug-free conditions. Therefore, this

model **lacks of face validity**, given that this condition differs from human typical relapse (Conklin and Tiffany 2002; Marlatt 1990; Sanchis-Segura and Spanagel 2006).

The alternative approach to evaluate relapse-like behaviour consists of the introduction of forced deprivation periods in animals with voluntary long-term access to the drug. After these deprivation periods, animals show a transient increase in the intake when the drug is reintroduced. In the case of ethanol, this phenomenon is called **Alcohol Deprivation Effect (ADE)** (Le Magnen 1960; Sinclair and Senter 1968). In contrast to reinstatement model, the ADE can be considered as a real model of relapse because it allows the individual to self-administer ethanol after a period of forced abstinence (Le and Shaham 2002; Sanchis-Segura and Spanagel 2006), showing **face validity** (Larimer *et al*, 1999), but also **construct validity** (Spanagel and Zieglgansberger 1997; Spanagel and Holter 2000; Spanagel and Kiefer 2008; Spanagel 2009). Consequently, the ADE model is considered as a **preclinical paradigm**. In spite of its disadvantages, such as, the relevance of the deprivation length to determine the appearance of the ADE phenomenon. Moreover, although it is a very robust phenomenon in rats, inconsistent results have been obtained in mice or hamster (Sinclair and Sheaff 1973; Spanagel 2003; Vengeliene *et al*, 2014). Finally, another relevant drawback is that there is not any direct assessment of psychological processes (Sanchis-Segura and Spanagel 2006).

Based on this body of evidence, previous studies of our research group selected the ADE model to evaluate the efficacy of DP to prevent the alcohol relapse-like drinking in a four-bottle **non-operant paradigm**. Thus, Orrico and

Discussion

colleagues (Orrico *et al*, 2013) showed that this ACD sequestering agent, subcutaneously and intra-pVTA administered, was able to prevent the ADE. Moreover, DP in combination with naltrexone (NTX) was able to overcome the preclinical limitations of NTX alone, i.e., the delayed ADE after continuous opioid receptor blockade (Orrico *et al*, 2014a).

Nonetheless, results of clinical studies have revealed that **the translational power of preclinical studies with animal models** is not as satisfactory as it was initially expected. To counter this problem in drug development, the National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) and the Division of Neuroscience and Behavior (DNB) initiated a Preclinical Medication Efficacy Testing Program to evaluate medications in three different rodent strains (Litten *et al*, 2012; Reilly *et al*, 2014). Additionally, there is no doubt among researchers that in order to maximize the translational power of preclinical research **it is important to gather evidence for as many paradigms and different animal models as possible** (Bell *et al*, 2012). Logically, the translational significance of findings achieved through the use of different preclinical models requires a rigorous validation. In this sense, it must be emphasized that the ultimate test related to the validity of a model is the demonstration of efficacy in the clinical environment.

According to these recommendations, and in order **to re-evaluate the preclinical efficacy of DP** as a potential anti-relapse treatment, the reproducibility of our previous data was investigated in a different laboratory (Complutense University of Madrid) and under different experimental conditions. Concretely, **ethanol relapse-like drinking behaviour was**

evaluated measuring the apparition of the ADE but in a self-administration operant paradigm (experiment 1), a method widely used in preclinical drug abuse research with face validity towards human drug consumption.

Similarly to home-cage testing, operant procedures allow evaluating the relapse-like drinking behaviour also using the ADE phenomenon. Indeed, the results of **experiment 1** showed as, after a period of deprivation, animals experienced the apparition of the ADE phenomenon (*Figure 5.19 and 5.20*), in a similar way as we had observed in our previous experiments (Orrico *et al*, 2013; 2014a). The levels of the daily ethanol response registered during the baseline and the post first-deprivation period were similar to those obtained in previous works using the same paradigm and rat strain (*Figure 5.20*) (Alen *et al*, 2009; Heyser *et al*, 1998; Lopez-Moreno *et al*, 2004). Moreover, this result exposed the specificity of the phenomenon due to the reinforcing properties of ethanol, since the increase was only presented in the active lever (*Figure 5.19 and 5.20*).

Discussion

- **Re-evaluation of the D-Penicillamine preclinical efficacy as a potential anti-relapse treatment**

As we have showed in this Thesis, **DP**, an agent that acts removing ethanol derived-ACD (Kera *et al*, 1985; Nagasawa *et al*, 1980) is able to suppress the activating effects of ethanol on VTA DA neurons. Theoretically, this agent **neither alter any neurotransmitter systems, nor impede ethanol access to the brain**; instead, DP would act preventing the 'priming' effect after ethanol consumption (De Wit 1996; Enrico *et al*, 2009; Font *et al*, 2006b; Ludwig and Wikler 1974; Orrico *et al*, 2013; Peana *et al*, 2010a; Sirca *et al*, 2011). This strategy is conceptually equivalent to that characterizing the use of vaccines against drug addiction (Shen *et al*, 2012). Vaccines prevent the access of the drug to the brain without interacting with any neurotransmission system, avoiding the usual secondary effects derived from this interaction. Unfortunately, this alternative has not been focused on the ethanol, probably due to its physicochemical properties.

As we indicated above, the rationale for the use of ACD sequestering agents is based on the pivotal role of this ethanol metabolite and its derivative, SAL, in the expression of the ethanol rewarding properties. This metabolite is directly related with the activation of the MCLD system subsequent to the ethanol administration (for review see Correa *et al*, 2012; Deehan *et al*, 2013a; 2013b). Recently, several researches have also demonstrated the **key role of ACD in the relapse-like drinking behaviour**. For example, our group has reported, in non-selected rats, that the ACD sequestration by DP, subcutaneously and intra-pVTA administered, is able to suppress the ADE phenomenon (Orrico *et al*, 2013; 2014a). Additionally,

Tampier and colleagues (Tampier *et al*, 2013) and Karahanian and colleagues (Karahanian *et al*, 2015) have shown, in an alcohol-preferring line of rats (UChB), that the blockade of the ethanol metabolism, through the intra-VTA administration of an antiCAT-coding vector and an ALDH2-coding vector, led to the inhibition of the ADE.

Curiously, in spite of the large body of evidence supporting the key participation of ACD in the ethanol neurobiological actions, there is almost any study about the ACD sequestering agents as a valid strategy to prevent relapse. Peana and colleagues (Peana *et al*, 2010a) demonstrated that the systemic administration of L-Cysteine (L-cys) (another ACD sequestering agent) reduced ethanol self-administration and reinstatement of ethanol-drinking-behaviour, being the first research group suggesting that ACD-hijacking agents could be a useful strategy. In our previous studies (Orrico *et al*, 2013; 2014a) and in this Thesis, we decided to prove the efficacy of DP for different reasons. First of all, different papers have shown that this compound is able to suppress some of the ethanol neurobehavioural effects (Correa *et al*, 2008; Enrico *et al*, 2009; Font *et al*, 2005; 2006a; 2006b; Ledesma *et al*, 2013; March *et al*, 2013; Pautassi *et al*, 2011; Peana *et al*, 2008). Secondly, DP-ACD adducts have been detected in the brain (Serrano *et al*, 2007), while some authors have suggested that L-cys could have a limited action *in vivo* (Hirayama *et al*, 1983; Nagasawa *et al*, 1980). Finally, DP is currently approved by the Food and Drug Administration and European Medicines Agency (Cuprimine®, Depen®, o Cupripen®) to treat Wilson's disease and rheumatoid arthritis, so if the preclinical studies would be successful, the approval of a new indication would be simpler.

Discussion

Experiment 2 of the present Thesis allowed us to re-evaluate our previous successful preclinical data with DP but using a different validated preclinical paradigm, operant self-administration procedure. To this end and after a forced deprivation period, animals were pre-treated with several doses of DP prior to being reintroduced into the operant chamber in order to examine the ability of this drug to curb relapse-like ethanol self-administration (i.e., the ADE). Although in our previous work (Orrico *et al*, 2013; 2014a) the drug was subcutaneously administered by a mini osmotic pump, due to the short elimination half-life of DP (Orrico *et al*, 2014b), in the present study we selected i.p. administration given the short time of the operant session (30 min). The DP doses were selected on the basis of our previous results (*Figure 5.2*), and previous works (Font *et al*, 2006b; Peana *et al*, 2008). The pharmacological treatment was initiated after the second deprivation period hence rats had experienced a previous deprivation phase. Result of this experiment showed that **DP, i.p. administered, was also able to prevent the ADE in Wistar rats using an operant paradigm**. According to our results, altogether, the three doses tested (6.25, 12.5, and 25 mg/kg) blocked the increase in ethanol response observed in the saline treated group following the imposed period of abstinence (*Figure 5.21 and 5.22B*). Interestingly, animals treated with the higher DP dose (25 mg/kg) significantly reduced their responding for ethanol, below the baseline levels (*Figure 5.22B*). Moreover, DP failed to affect responses on inactive lever, indicating a lack of nonspecific behavioural impairment.

It should be mentioned that high inter-individual differences were observed in the number of lever responses for ethanol, especially during the Reintroduction 2 period, which led to a great variability in the daily mean of responses, as can be observed in the *Figure 5.21*. So far, it is not clear which factors, apart from the genetic make-up of an animal, are responsible for the variability in the relapse-like behaviour observed in rodents (Vengeliene *et al*, 2014). In fact, given the great response variability, the effect of DP treatment on the ADE could not be analysed by a classical mixed two-way ANOVA (see section 4.2.5). Instead, the number of lever responses for ethanol obtained in the five days before and after the abstinence period were collapsed and compared by a paired Student t-test. With this presentation of the data, the effect of the DP treatment is put in evidence more clearly as can be seen in the *Figure 5.21* (upper panels) and *5.22*.

On the other hand, during Baseline 2 (from day 98 to 102) animals were daily i.p. injected with saline in order to accustom them to the administration procedure. Animals were also treated on a daily basis with i.p. saline the last three days of the second deprivation period (see *Figure 4.14*). This procedure pretended to prevent the effect of animal manipulation during the i.p administration on the lever pressing and hence to assure that the measured DP effect on the ethanol responding was drug specific. As shown in *Figure 5.22*, the occurrence of an ADE is observed whenever animals were (*Figure 5.22B*) or were not (*Figure 5.22A*) i.p. injected, indicating a **lack of effect of the administration routine on the lever responding**. Accordingly, responding for ethanol was significantly increased after the first and the

Discussion

second deprivation period, when animals received saline ($p < 0.0001$), as expected.

Previous studies have suggested that DP effects on alcohol intake could be due to a change in taste of fluids and food. This phenomenon was demonstrated for both sucrose and ethanol in rats (Font *et al*, 2006b) when DP was i.p. administered at the 50 mg/kg dose. Hence, we cannot fully rule out the possibility that, at least, part of the preventive effects of DP on ADE could be produced by an alteration of flavour. Nonetheless, previous studies have shown that, in animals with a long-term alcohol-drinking history, ethanol intake during the reintroduction after an abstinence period remained unaltered either after presentation of a highly palatable sucrose solution or even after presentation of an adulterated ethanol solution by quinine (a high aversive bitter taste substance) (Aravich and Sclafani 1980; Spanagel and Holter 1999; Wolffgramm and Heyne 1991). These results suggest that ethanol exerts specific effects, independent of nutritional status or organoleptic characteristics of the solutions offered to the animals (Dole 1986). Moreover, Font and colleagues (Font *et al*, 2006b) also demonstrated that DP, after ICV injected, retains its depressing effect on voluntary ethanol consumption without altering sucrose intake, clearly suggesting that part of its preventing effects are due to the central sequestration of ACD. In agreement with this finding, our group showed that the bilateral intra-pVTA administration of DP is capable to suppress the ADE in a four-bottle non-operant paradigm (Orrico *et al*, 2013), suggesting that, as occurred in the experiments by Font and colleagues, the preventive effects of DP on ADE could be, at least in part, specific. Moreover, in recent studies, using the

four-bottle non-operant paradigm, we have observed that DP subcutaneously administered did not alter voluntary ethanol consumption neither in rats with a long-term alcohol-drinking history nor in rats with no previous alcohol experience. Therefore, we can conclude that DP systemically administered exerts its anti-relapse effects, at least in part, by a mechanism independent of taste alteration.

Although we previously reported that the acute i.p. administration of DP at 25 mg/kg does not modify the motor activity of the rats with respect to the vehicle group (*Figure 5.2*), in **experiment 3** of this study we evaluated the rearing, horizontal and total activity immediately after the fifth operant session (in the Reintroduction 2 period) in the group of rats chronically treated with this dose. As shown in the *Figure 5.24*, **DP treatment did not alter the horizontal activity neither the rearing nor the total activity**, during the 20 min session. Hence, the possibility of a reduction in the responding for ethanol caused by a motor impairment provoked by DP could be ruled out. In **experiment 4**, the blood ethanol concentrations were determined at the end of the experiment (sixth day of the Reintroduction 2 period). These concentrations, which could be considered pharmacologically relevant (Weiss *et al*, 1993), showed a positive relationship with the responses executed (*Figure 5.25*), ensuring that **the delivered reinforcers could be equated to the number of consumed reinforcers**.

In our opinion, the present work demonstrates the **robustness of the reported effect** (the DP efficacy to prevent relapse-like drinking effect) and the **validity of attempted replications**. As recently discussed (Steckler 2015), preclinical data reproducibility is, at present, a great challenge for

Discussion

Neuroscience. Some authors highlight that insufficient data reproducibility is a major concern not only in academia but also in pharmaceutical industry. Particularly, in this latter case, the lack of reproducibility may lead to delays in drug development (Mobley *et al*, 2013). Consequently, several organizations have started to take action and important steps toward improved data reproducibility have been made (Nature Editorial 2013). In the present study, we have been able to replicate our previous results in a different laboratory (Laboratory of Psychobiology, Complutense University of Madrid) and using a different paradigm, achieving stable and consistent results (**inter-lab reliability**) leading to more solid conclusions on the use of DP as potential new pharmacotherapy in the treatment of alcoholism. Moreover, we have already assessed the **intra-lab reliability** in a previous paper by demonstrating that the therapeutic strategy of combining DP and NTX shows an adequate anti-relapse preclinical efficacy in long-term ethanol-experienced rats, being able to overcome some limitations of either drug alone (Orrico *et al*, 2014a).

To summarize, the present results can be considered a way for providing robustness to our previous preclinical data showing that the use of sequestering ACD-agents such as DP could represent a new and promising strategy to prevent ethanol relapse. We are aware that, as recommended by the NIAAA and in order to place DP on a faster track along the pipeline from preclinical testing to clinical trials, it is imperative to confirm the DP efficacy in selectively bred high alcohol-consuming rat lines that display the ADE (e.g., P, HAD rats).

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Summary and conclusions

The main goal of the present Thesis has been to explore the mechanism of action of ethanol using a behavioural approximation, which could present a step forward in the development of more efficacious pharmacological treatments for alcoholism.

First, we planned several experiments, to study the possibility that ethanol could exert two opposite and simultaneous effects on VTA DA neuron activity. To this end, we analyse one of the most conspicuous behavioural consequences of DA mesolimbic neuron stimulation, the locomotor activation. Through the motor behaviour analysis of the animals after intra-pVTA administration of ethanol, and using adequate pharmacological strategies to increase or decrease ACD levels, we investigate: (i) whether the activation of DA neurons after ethanol administration are mediated by the products resulting from the local metabolism of ethanol, ACD and/or SAL; (ii) the possible role of the MORs located in VTA GABA neurons in the activating effect; (iii) whether the inhibitory effects are triggered by the non-metabolized fraction of ethanol; and (iv) the possible implication of the GABA_A-Rs as mediators of this inhibitory action.

Since our experiments showed that ACD is necessary for VTA DA activation after ethanol administration, the experiments performed in the second part of this Doctoral Thesis were aimed to analyse the efficacy of a new therapeutic strategy to prevent alcohol relapse, the use of the ACD sequestering agent DP. The efficacy of DP was evaluated measuring the expression of the ADE phenomenon (a preclinical model), from an operant self-administration paradigm.

Summary and conclusions

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

- I. The intra-pVTA administration of ethanol gives rise to two simultaneous and opposing effects on the VTA DA neuron activity, reflected as an increase or decrease of rats motor behaviour.
- II. The administration of a low dose of ethanol (35 nmol), into pVTA, does not induce any significant change in the locomotor activity of rats, suggesting that, at this dose, both effects tend to offset each other.
- III. The by-products resulting from ethanol brain metabolism, ACD and/or SAL, could be the responsible for the excitation of the DA neurons in the VTA. In this sense, the increase of the ACD levels in the VTA, after the administration of an inactive dose of ethanol (35 nmol), results in an increase of the animals locomotor activity.
- IV. The local blockade of the MORs are able to suppress the locomotor activation induced by the intra-pVTA administration of ethanol, suggesting the participation of these receptors in the ethanol-derived activating effects.

Summary and conclusions

- V.** Ethanol *per se* seems to account for the inhibitory effects of the neuronal activity. Pre-treatments aimed to reduce the ACD levels in the VTA, allow us to unmask the motor depression elicited by ethanol.

- VI.** GABA_A-Rs could act as mediator of the depressing effects produced by the non-metabolized fraction of ethanol. This is based on several observed evidences: the blockade of these receptors (i) induces an increase the motor activity in animals receiving 35 nmol of ethanol, and (ii) prevents the motor depression produced by the reduction of ACD levels after the administration of a low dose of ethanol.

- VII.** The systemic administration of DP is able to suppress the ADE phenomenon in an operant paradigm, without altering rat basal activity, suggesting that this compound is effective to prevent the ethanol relapse-like drinking behaviour.

8. REFERENCES

References

- Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Kogame M, Ninomiya I, Naito T (1986). Effect of acetaldehyde on urinary salsolinol in healthy man after ethanol intake. *Alcohol* **3**: 215-220.
- Addolorato G, Leggio L, Hopf FW, Diana M, Bonci A (2012). Novel therapeutic strategies for alcohol and drug addiction: focus on GABA, ion channels and transcranial magnetic stimulation. *Neuropsychopharmacology* **37**: 163-177.
- Alen F, Gomez R, Gonzalez-Cuevas G, Navarro M, Lopez-Moreno JA (2009). Nicotine causes opposite effects on alcohol intake: Evidence in an animal experimental model of abstinence and relapse from alcohol. *Nicotine Tob Res* **11**: 1304-1311.
- Altshuler HL, Phillips PE, Feinhandler DA (1980). Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. *Life Sci* **26**: 679-688.
- Amit Z and Aragon 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 (1977). Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration. *Drug Alcohol Depend* **2**: 495-500.
- Andlin-Sobocki P and Rehm J (2005). Cost of addiction in Europe. *Eur J Neurol* **12 Suppl 1**: 28-33.
- Antkiewicz-Michaluk L, Romanska I, Papla I, Michaluk J, Bakalarz M, Vetulani J *et al* (2000). Neurochemical changes induced by acute and chronic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol in dopaminergic structures of rat brain. *Neuroscience* **96**: 59-64.
- Anton RF, Oroszi G, O'Malley S, Couper D, Swift R, Pettinati H *et al* (2008). An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the Combined Pharmacotherapies and Behavioral Interventions for Alcohol Dependence (COMBINE) study. *Arch Gen Psychiatry* **65**: 135-144.
- Anton RF, Pettinati H, Zweben A, Kranzler HR, Johnson B, Bohn MJ *et al* (2004). A multi-site dose ranging study of nalmefene in the treatment of alcohol dependence. *J Clin Psychopharmacol* **24**: 421-428.

References

Aragon 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.

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

Aragon 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.

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

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

Aragon CMG, Miquel M, Correa M, Sanchis-Segura C (2002). Alcohol y Metabolismo humano. *Adicciones* **14**: 23-42.

Aravich PF and Sclafani A (1980). Dietary preference behavior in rats fed bitter tasting quinine and sucrose octa acetate adulterated diets. *Physiol Behav* **25**: 157-160.

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

Arizzi-LaFrance MN, Correa M, Aragon 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.

Arnt J and Scheel-Kruger J (1979). GABA in the ventral tegmental area: differential regional effects on locomotion, aggression and food intake after microinjection of GABA agonists and antagonists. *Life Sci* **25**: 1351-1360.

Bachteler D, Economidou D, Danysz W, Ciccocioppo R, Spanagel R (2005). The effects of acamprosate and neramexane on cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior in rat. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1104-1110.

References

- Bart G, Schluger JH, Borg L, Ho A, Bidlack JM, Kreek MJ (2005). Nalmefene induced elevation in serum prolactin in normal human volunteers: partial kappa opioid agonist activity? *Neuropsychopharmacology* **30**: 2254-2262.
- Baum SS, Hill R, Kiianmaa K, Rommelspacher H (1999). Effect of ethanol on (R)- and (S)-salsolinol, salsoline, and THP in the nucleus accumbens of AA and ANA rats. *Alcohol* **18**: 165-169-165-169.
- 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.
- Belin-Rauscent A, Fouyssac M, Bonci A, Belin D (2015). How Preclinical Models Evolved to Resemble the Diagnostic Criteria of Drug Addiction. *Biol Psychiatry* .
- Bell RL, Sable HJ, Colombo G, Hyytia P, Rodd ZA, Lumeng L (2012). Animal models for medications development targeting alcohol abuse using selectively bred rat lines: neurobiological and pharmacological validity. *Pharmacol Biochem Behav* **103**: 119-155.
- Berglund M, Balldin J, Bendtsen P, Borg S, Franck J, Gustafsson L *et al* (1997). Pharmacological treatment of alcohol dependence. Acamprosate and naltrexone offer new approach. *Lakartidningen* **94**: 2645-2648.
- Bergmark A (2008). On treatment mechanisms--what can we learn from the COMBINE study? *Addiction* **103**: 703-705.
- 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.
- Bienkowski P, Kostowski W, Koros E (1999). Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *Eur J Pharmacol* **374**: 321-327.
- Blednov YA and Harris RA (2008). Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: relationship to acamprosate actions. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**: 775-793.
- Blum K, Hamilton MG, Hirst M, Wallace JE (1978). Putative role of isoquinoline alkaloids in alcoholism: a link to opiates. *Alcohol Clin Exp Res* **2**: 113-120.

References

- Bossert JM, Marchant NJ, Calu DJ, Shaham Y (2013). The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology (Berl)* **229**: 453-476.
- Bourdy R and Barrot M (2012). A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci* **35**: 681-690.
- Brodie MS and 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 and 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, 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, 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.
- Brown ZW, 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.
- Brown MT, Henny P, Bolam JP, Magill PJ (2009). Activity of neurochemically heterogeneous dopaminergic neurons in the substantia nigra during spontaneous and driven changes in brain state. *J Neurosci* **29**: 2915-2925.
- Brown ZW, Amit Z, Rockman GE (1979). Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology (Berl)* **64**: 271-276.

References

- Buckholtz NS (1980). Neurobiology of tetrahydro-beta-carbolines. *Life Sci* **27**: 893-903.
- Burish TG, Maisto SA, Cooper AM, Sobell MB (1981). Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. *J Stud Alcohol* **42**: 1013-1020.
- 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.
- Campbell AD, Kohl RR, McBride WJ (1996). Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release. *Alcohol* **13**: 569-574.
- Cano-Cebrian MJ, Zornoza-Sabina T, Guerri C, Polache A, Granero L (2003). Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **367**: 119-125.
- Carr DB and Sesack SR (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* **38**: 114-123.
- Chao HM (1995). Alcohol and the mystique of flushing. *Alcohol Clin Exp Res* **19**: 104-109.
- 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 *et al* (2004). Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* **24**: 972-981.
- Church AC, Fuller JL, Dudek BC (1977). Behavioral effects of salsolinol and ethanol on mice selected for sensitivity to alcohol-induced sleep time. *Drug Alcohol Depend* **2**: 443-452.
- Church AC, Fuller JL, Dudek BC (1976). Salsolinol differentially affects mice selected for sensitivity to alcohol. *Psychopharmacology (Berl)* **47**: 49-52.
- Ciccocioppo R (2013). Genetically selected alcohol preferring rats to model human alcoholism. *Curr Top Behav Neurosci* **13**: 251-269.

References

Cohen G (1976). Alkaloid products in the metabolism of alcohol and biogenic amines. *Biochem Pharmacol* **25**: 1123-1128.

Cohen G and 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.

Cohen JF, Elberling JA, DeMaster EG, Lin RC, Nagasawa HT (2000). N-Terminal dipeptides of D(-)-penicillamine as sequestration agents for acetaldehyde. *J Med Chem* **43**: 1029-1033.

Collins MA and Bigdeli MG (1975). Tetrahydroisoquinolines in vivo. I. Rat brain formation of salsolinol, a condensation product of dopamine and acetaldehyde, under certain conditions during ethanol intoxication. *Life Sci* **16**: 585-601.

Collins MA, Nijm WP, Borge GF, Teas G, Goldfarb C (1979). Dopamine-related tetrahydroisoquinolines: significant urinary excretion by alcoholics after alcohol consumption. *Science* **206**: 1184-1186.

Collins MA, Ung-Chhun N, Cheng BY, Pronger D (1990). Brain and plasma tetrahydroisoquinolines in rats: effects of chronic ethanol intake and diet. *J Neurochem* **55**: 1507-1514.

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.

Conklin CA and Tiffany ST (2002). Cue-exposure treatment: time for change. *Addiction* **97**: 1219-1221.

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

Cornish JL and 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.

Correa M, Acquas E, Salamone JD (2014). The renaissance of acetaldehyde as a psychoactive compound: decades in the making. *Front Behav Neurosci* **8**: 249.

References

- Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003a). Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology (Berl)* **170**: 368-375.
- Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003b). Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res Bull* **62**: 197-202.
- Correa M, Arizzi-Lafrance MN, Salamone JD (2009). Infusions of acetaldehyde into the arcuate nucleus of the hypothalamus induce motor activity in rats. *Life Sci* **84**: 321-327.
- Correa M, Manrique HM, Font L, Escrig MA, Aragon 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, Miquel M, Aragon 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, Sanchis-Segura C, Aragon CM (1999). Acute lead acetate administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: the role of brain catalase. *Alcohol Clin Exp Res* **23**: 799-805.
- Correa M, Pascual M, Sanchis-Segura C, Guerri C, Aragon 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, Aragon CM (2004a). Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sci* **74**: 2009-2021.
- Correa M, Salamone JD, Segovia KN, Pardo M, Longoni R, Spina L *et al* (2012). Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neurosci Biobehav Rev* **36**: 404-430.
- Correa M, Sanchis-Segura C, Pastor R, Aragon CM (2004b). Ethanol intake and motor sensitization: the role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiol Behav* **82**: 231-240.

References

Criswell HE, Ming Z, Kelm MK, Breese GR (2008). Brain regional differences in the effect of ethanol on GABA release from presynaptic terminals. *J Pharmacol Exp Ther* **326**: 596-603.

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 and Walsh MJ (1970). Alcohol addiction and tetrahydropapaveroline. *Science* **169**: 1105-1106.

De Wit H (1996). Priming effects with drugs and other reinforcers. . *Experimental and clinical psychopharmacology* **4. Special Section: Relapse to Substance Abuse: Recent Findings From Basic and Clinical Research.:** 5-10.

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.

Debarbieux F, Brunton J, Charpak S (1998). Effect of bicuculline on thalamic activity: a direct blockade of IAHP in reticularis neurons. *J Neurophysiol* **79**: 2911-2918.

DeCuyper M, Lu Y, Miller DD, LeDoux MS (2008). Regional distribution of tetrahydroisoquinoline derivatives in rodent, human, and Parkinson's disease brain. *J Neurochem* **107**: 1398-1413.

Deehan GA,Jr, Brodie MS, Rodd ZA (2013a). What is in that drink: the biological actions of ethanol, acetaldehyde, and salsolinol. *Curr Top Behav Neurosci* **13**: 163-184.

Deehan GA,Jr, Engleman EA, Ding ZM, McBride WJ, Rodd ZA (2013b). Microinjections of acetaldehyde or salsolinol into the posterior ventral tegmental area increase dopamine release in the nucleus accumbens shell. *Alcohol Clin Exp Res* **37**: 722-729.

Deehan GA,Jr, Hauser SR, Wilden JA, Truitt WA, Rodd ZA (2013c). Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol. *Front Behav Neurosci* **7**: 104.

Deitrich RA (2004). Acetaldehyde: deja vu du jour. *J Stud Alcohol* **65**: 557-572.

Deitrich RA, Bludeau P, Roper M, Schmuck J (1978). Induction of aldehyde dehydrogenases. *Biochem Pharmacol* **27**: 2347-2347.

References

- DeMaster EG, Shirota FN, Nagasawa HT (1985). Catalase mediated conversion of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* **2**: 117-121.
- Deng C, Li KY, Zhou C, Ye JH (2009). Ethanol enhances glutamate transmission by retrograde dopamine signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1233-1244.
- Devine DP and Wise RA (1994). Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* **14**: 1978-1984.
- Di Chiara G and Imperato A (1988). Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* **244**: 1067-1080.
- Di Chiara G and North RA (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 185-193.
- 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, Ingraham CM, Rodd ZA, McBride WJ (2015). The reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area depend on dopamine neurotransmission to forebrain cortico-limbic systems. *Addict Biol* **20**: 458-468.
- Ding ZM, Liu W, Engleman EA, Rodd ZA, McBride WJ (2009a). Differential effects of dopamine D2 and GABA(A) receptor antagonists on dopamine neurons between the anterior and posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* **92**: 404-412.
- Ding ZM, Toalston JE, Oster SM, McBride WJ, Rodd ZA (2009b). Involvement of local serotonin-2A but not serotonin-1B receptors in the reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* **204**: 381-390.
- Dole VP (1986). On the relevance of animal models to alcoholism in humans. *Alcohol Clin Exp Res* **10**: 361-363.
- Dostert P, Benedetti MS, Bellotti V, Allievi C, Dordain G (1990). Biosynthesis of salsolinol, a tetrahydroisoquinoline alkaloid, in healthy subjects. *J Neural Transm Gen Sect* **81**: 215-223.

References

Drobes DJ, Anton RF, Thomas SE, Voronin K (2004). Effects of naltrexone and nalmefene on subjective response to alcohol among non-treatment-seeking alcoholics and social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* **28**: 1362-1370.

Duncan C and Deitrich RA (1980). A critical evaluation of tetrahydroisoquinoline induced ethanol preference in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **13**: 265-281.

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

Edwards S, Kenna GA, Swift RM, Leggio L (2011). Current and promising pharmacotherapies, and novel research target areas in the treatment of alcohol dependence: a review. *Curr Pharm Des* **17**: 1323-1332.

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

Erdozain AM and Callado LF (2014). Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones* **26**: 360-370.

Ericson M, Lof E, Stomberg R, Chau P, Soderpalm B (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in the anterior, but not posterior, ventral tegmental area mediate ethanol-induced elevation of accumbal dopamine levels. *J Pharmacol Exp Ther* **326**: 76-82.

Eriksson CJ and Fukunaga T (1993). Human blood acetaldehyde (update 1992). *Alcohol Alcohol Suppl* **2**: 9-25.

Eriksson CJ, Hillbom ME, Sovijarvi AR (1980). Difficulties in measuring human blood acetaldehyde concentrations during ethanol intoxication. *Adv Exp Med Biol* **126**: 439-451.

Eriksson CJ and 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, Aragon CM (2001). L-cysteine, a thiol amino acid, increases the stimulating acute effect of ethanol on locomotion. *Alcohol* **25**: 83-88.

References

- Escarabajal MD and Aragon 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 and Aragon CM (2003). DDTC, a metabolite of disulfiram, reduces the stimulating effect on ethanol's locomotor activity in mice. *Psychopharmacol Bull* **37**: 113-119.
- Escarabajal MD and Aragon CM (2002b). The effect of cyanamide and 4-methylpyrazole on the ethanol-induced locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **72**: 389-395.
- European Medicine Agency (EMA) (2010). **Guideline on the development of medicinal products for the treatment of alcohol dependence.** www.ma.europa.eu .
- 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.
- Faraj BA, Camp VM, Davis DC, Lenton JD, Kutner M (1989). Elevation of plasma salsolinol sulfate in chronic alcoholics as compared to nonalcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* **13**: 155-163.
- Federici M, Nistico R, Giustizieri M, Bernardi G, Mercuri NB (2009). Ethanol enhances GABAB-mediated inhibitory postsynaptic transmission on rat midbrain dopaminergic neurons by facilitating GIRK currents. *Eur J Neurosci* **29**: 1369-1377.
- Fertel RH, Greenwald JE, Schwarz R, Wong L, Bianchine J (1980). Opiate receptor binding and analgesic effects of the tetrahydroisoquinolines salsolinol and tetrahydropapaveroline. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **27**: 3-16.
- 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.
- Foddai M, Dosia G, Spiga S, Diana M (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology* **29**: 530-536.

References

- Font L, Aragon CM, Miquel M (2006a). 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, Aragon CM, Miquel M (2006b). Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behav Brain Res* **171**: 78-86.
- Font L, Lujan MA, Pastor R (2013). Involvement of the endogenous opioid system in the psychopharmacological actions of ethanol: the role of acetaldehyde. *Front Behav Neurosci* **7**: 93.
- Font L, Miquel M, Aragon CMG (2005). Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: A sequestration agent for acetaldehyde. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **29**: 1156-1164.
- Ford CP, Mark GP, Williams JT (2006). Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J Neurosci* **26**: 2788-2797.
- Franck J and Jayaram-Lindstrom N (2013). Pharmacotherapy for alcohol dependence: status of current treatments. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 692-699.
- Frye GD and Breese GR (1981). An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)* **75**: 372-379.
- Gallegos RA, Lee RS, Criado JR, Henriksen SJ, Steffensen SC (1999). Adaptive responses of gamma-aminobutyric acid neurons in the ventral tegmental area to chronic ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 1045-1053.
- Garzon M and Pickel VM (2001). Plasmalemmal mu-opioid receptor distribution mainly in nondopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. *Synapse* **41**: 311-328.
- Gatto GJ, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK (1994). Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* **11**: 557-564.
- Geisler S and 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 and 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.

References

- 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.
- Gianoulakis C (1990). Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* **180**: 21-29.
- Gianoulakis C (2009). Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem* **9**: 999-1015.
- 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 and 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.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* **7**: 77-85.
- Gonzales RA, Job MO, Doyon WM (2004). The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther* **103**: 121-146.
- Grace AA and Bunney BS (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**: 2877-2890.
- Grace AA and Bunney BS (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* **4**: 2866-2876.
- Graziane NM, Polter AM, Briand LA, Pierce RC, Kauer JA (2013). Kappa opioid receptors regulate stress-induced cocaine seeking and synaptic plasticity. *Neuron* **77**: 942-954.
- Gual A, He Y, Torup L, van den Brink W, Mann K, ESENSE 2 Study Group (2013). A randomised, double-blind, placebo-controlled, efficacy study of nalmefene, as-needed use, in patients with alcohol dependence. *Eur Neuropsychopharmacol* **23**: 1432-1442.

References

Guan Y, Xiao C, Krnjevic K, Xie G, Zuo W, Ye JH (2012). GABAergic actions mediate opposite ethanol effects on dopaminergic neurons in the anterior and posterior ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* **341**: 33-42.

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

Haber H, Winkler A, Putscher I, Henklein P, Baeger I, Georgi M *et al* (1996). Plasma and urine salsolinol in humans: effect of acute ethanol intake on the enantiomeric composition of salsolinol. *Alcohol Clin Exp Res* **20**: 87-92.

Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* **20**: 2369-2382.

Hald J and Jacobsen E (1948). A drug sensitizing the organism to ethyl alcohol. *Lancet* **2**: 1001-1004.

Heilig M, Goldman D, Berrettini W, O'Brien CP (2011). Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nat Rev Neurosci* **12**: 670-684.

Herz A (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* **129**: 99-111.

Heyne A, May T, Goll P, Wolffgramm J (2000). Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. *J Neural Transm* **107**: 613-638.

Heyser CJ, Moc K, Koob GF (2003). Effects of naltrexone alone and in combination with acamprosate on the alcohol deprivation effect in rats. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1463-1471.

Heyser CJ, Schulteis G, Durbin P, Koob GF (1998). Chronic acamprosate eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacology* **18**: 125-133.

Hillemecher T, Leggio L, Heberlein A (2015). Investigational therapies for the pharmacological treatment of alcoholism. *Expert Opin Investig Drugs* **24**: 17-30.

References

- Hipolito L, Marti-Prats L, Sanchez-Catalan MJ, Polache A, Granero L (2011). Induction of conditioned place preference and dopamine release by salsolinol in posterior VTA of rats: involvement of mu-opioid receptors. *Neurochem Int* **59**: 559-562.
- Hipolito L, Sanchez MJ, Polache A, Granero L (2007). Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. *Curr Drug Metab* **8**: 716-727.
- Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Granero L, Polache A (2009). Local salsolinol modulates dopamine extracellular levels from rat nucleus accumbens: shell/core differences. *Neurochem Int* **55**: 187-192.
- Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Marti-Prats L, Granero L, Polache A (2012). Revisiting the controversial role of salsolinol in the neurobiological effects of ethanol: old and new vistas. *Neurosci Biobehav Rev* **36**: 362-378.
- Hipolito 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.
- Hipolito 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.
- Hirayama C, Kishimoto Y, Wakushima T, Murawaki Y (1983). Mechanism of the protective action of thiol compounds in ethanol-induced liver injury. *Biochem Pharmacol* **32**: 321-325.
- Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H *et al* (2005). Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* **135**: 213-225.
- Hjelmstad GO, Xia Y, Margolis EB, Fields HL (2013). Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. *J Neurosci* **33**: 6454-6459.
- Holter SM, Landgraf R, Zieglgansberger W, Spanagel R (1997). Time course of acamprosate action on operant ethanol self-administration after ethanol deprivation. *Alcohol Clin Exp Res* **21**: 862-868.

References

- Holter SM and Spanagel R (1999). Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)* **145**: 360-369.
- Howard EC, Schier CJ, Wetzel 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.
- 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.
- Ibba F, Vinci S, Spiga S, Peana AT, Assaretti AR, Spina L *et al* (2009). Ethanol-induced extracellular signal regulated kinase: role of dopamine D1 receptors. *Alcohol Clin Exp Res* **33**: 858-867.
- Ikemoto S (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* **35**: 129-150.
- 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 and Bonci A (2014). Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology* **76 Pt B**: 329-341.
- 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 and 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 and 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.
- Israel Y, Quintanilla ME, Karahanian E, Rivera-Meza M, Herrera-Marschitz M (2015). The "first hit" toward alcohol reinforcement: role of ethanol metabolites. *Alcohol Clin Exp Res* **39**: 776-786.
- Jacobsen E (1952). The metabolism of ethyl alcohol. *Nature* **169**: 645-647.

References

- Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M *et al* (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16446-16450.
- Jamal M, Ameno K, Ameno S, Okada N, Ijiri I (2003a). Effect of different doses of cyanamide on striatal salsolinol formation after ethanol treatment. *Leg Med (Tokyo)* **5 Suppl 1**: S79-82.
- Jamal M, Ameno K, Ameno S, Okada N, Ijiri I (2003b). In vivo study of salsolinol produced by a high concentration of acetaldehyde in the striatum and nucleus accumbens of free-moving rats. *Alcohol Clin Exp Res* **27**: 79S-84S.
- Jamal M, Ameno K, Kubota T, Ameno S, Zhang X, Kumihashi M *et al* (2003c). In vivo formation of salsolinol induced by high acetaldehyde concentration in rat striatum employing microdialysis. *Alcohol and Alcoholism* **38**: 197-201.
- Jamal M, Ameno K, Kumihashi M, Ameno S, Kubota T, Wang W *et al* (2003d). Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **798**: 155-158.
- Jamal M, Ameno K, Uekita I, Kumihashi M, Wang W, Ijiri I (2007). Catalase mediates acetaldehyde formation in the striatum of free-moving rats. *Neurotoxicology* **28**: 1245-1248.
- 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.
- Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* **61**: 786-800.
- Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol* **513**: 566-596.
- Johnson BA (2008). Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Biochem Pharmacol* **75**: 34-56.

References

- Johnson SW, Mercuri NB, North RA (1992). 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors block the GABAB synaptic potential in rat dopamine neurons. *J Neurosci* **12**: 2000-2006.
- Johnson SW and North RA (1992a). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**: 483-488.
- Johnson SW and North RA (1992b). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* **450**: 455-468.
- Jupp B and Lawrence AJ (2010). New horizons for therapeutics in drug and alcohol abuse. *Pharmacol Ther* **125**: 138-168.
- Kalivas PW (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* **18**: 75-113.
- Karahanian E, Quintanilla ME, Tampier L, Rivera-Meza M, Bustamante D, Gonzalez-Lira V *et al* (2011). Ethanol as a prodrug: brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcohol Clin Exp Res* **35**: 606-612.
- Karahanian E, Rivera-Meza M, Tampier L, Quintanilla ME, Herrera-Marschitz M, Israel Y (2015). Long-term inhibition of ethanol intake by the administration of an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)-coding lentiviral vector into the ventral tegmental area of rats. *Addict Biol* **20**: 336-344.
- Karhuvaara S, Simojoki K, Virta A, Rosberg M, Loyttyniemi E, Nurminen T *et al* (2007). Targeted nalmefene with simple medical management in the treatment of heavy drinkers: a randomized double-blind placebo-controlled multicenter study. *Alcohol Clin Exp Res* **31**: 1179-1187.
- Katner SN, Magalong JG, Weiss F (1999). Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacology* **20**: 471-479.
- Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol* **513**: 597-621.
- 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.

References

- Keselman HJ, Games PA, Rogan JC (1980). Type I and Type II errors in simultaneous and two-stage multiple comparison procedures. *Psychological Bulletin* **88**: 356-358.
- Kessler DA (2005). Alcohol marketing and youth: the challenge for public health. *J Public Health Policy* **26**: 292-295.
- Kiefer F and Mann K (2010). Acamprosate: how, where, and for whom does it work? Mechanism of action, treatment targets, and individualized therapy. *Curr Pharm Des* **16**: 2098-2102.
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R (1999). Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 690-697.
- Koechling UM and 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.
- Kohl RR, Katner JS, Chernet E, McBride WJ (1998). Ethanol and negative feedback regulation of mesolimbic dopamine release in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **139**: 79-85.
- Koob GF and Le Moal M (2006): Neurobiology of addiction. Academic Press: New York.
- Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998). Neuroscience of addiction. *Neuron* **21**: 467-476.
- Koob GF and Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* **35**: 217-238.
- Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO *et al* (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev* **64**: 520-539.
- Kornet M, Goosen C, Van Ree JM (1991). Effect of naltrexone on alcohol consumption during chronic alcohol drinking and after a period of imposed abstinence in free-choice drinking rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **104**: 367-376.
- Koyama S, Brodie MS, Appel SB (2007). Ethanol inhibition of m-current and ethanol-induced direct excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol* **97**: 1977-1985.

References

Kranzler HR and Van Kirk J (2001). Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* **25**: 1335-1341.

Kunin D, Latendresse MW, Gaskin S, Smith BR, Amit Z (2000). Preexposure effects of nicotine and acetaldehyde on conditioned taste aversion induced by both drugs. *Pharmacol Biochem Behav* **66**: 695-699.

Lam MP, Marinelli PW, Bai L, Gianoulakis C (2008). Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* **201**: 261-271.

Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* **57**: 760-773.

Lammel S, Ion DI, Roeper J, Malenka RC (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* **70**: 855-862.

Lammel S, Lim BK, Malenka RC (2014). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology* **76 Pt B**: 351-359.

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

Larimer ME, Palmer RS, Marlatt GA (1999). Relapse prevention. An overview of Marlatt's cognitive-behavioral model. *Alcohol Res Health* **23**: 151-160.

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.

Lavezzi HN and Zahm DS (2011). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia* **1**: 191-200.

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.

Le Magnen J (1960). Study of some factors associated with modifications of spontaneous ingestion of ethyl alcohol by the rat. *J Physiol (Paris)* **52**: 873-884.

References

- Le A and Shaham Y (2002). Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacol Ther* **94**: 137-156.
- Le AD, Poulos CX, Harding S, Watchus J, Juzysch W, Shaham Y (1999). Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology* **21**: 435-444.
- Ledesma JC and Aragon CM (2013). Acquisition and reconditioning of ethanol-induced conditioned place preference in mice is blocked by the H₂O₂ scavenger alpha lipoic acid. *Psychopharmacology (Berl)* **226**: 673-685.
- Ledesma JC and Aragon CM (2012). alpha-Lipoic acid, a scavenging agent for H₂O₂, reduces ethanol-stimulated locomotion in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **219**: 171-180.
- Ledesma JC, Balino P, Aragon CM (2014). Reduction in central H₂O₂ levels prevents voluntary ethanol intake in mice: a role for the brain catalase-H₂O₂ system in alcohol binge drinking. *Alcohol Clin Exp Res* **38**: 60-67.
- Ledesma JC, Font L, Aragon CM (2012). The H₂O₂ scavenger ebselen decreases ethanol-induced locomotor stimulation in mice. *Drug Alcohol Depend* **124**: 42-49.
- Ledesma JC, Font L, Balino P, Aragon CM (2013). Modulation of ethanol-induced conditioned place preference in mice by 3-amino-1,2,4-triazole and D-penicillamine depends on ethanol dose and number of conditioning trials. *Psychopharmacology (Berl)* **230**: 557-568.
- Lee J, Ramchandani VA, Hamazaki K, Engleman EA, McBride WJ, Li TK *et al* (2010). A critical evaluation of influence of ethanol and diet on salsolinol enantiomers in humans and rats. *Alcohol Clin Exp Res* **34**: 242-250.
- Leggio L, Cardone S, Ferrulli A, Kenna GA, Diana M, Swift RM *et al* (2010). Turning the clock ahead: potential preclinical and clinical neuropharmacological targets for alcohol dependence. *Curr Pharm Des* **16**: 2159-2118.
- Li TK (2000). Pharmacogenetics of responses to alcohol and genes that influence alcohol drinking. *J Stud Alcohol* **61**: 5-12.
- Lindvall O and Bjorklund A (1978). Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Adv Biochem Psychopharmacol* **19**: 1-23.

References

- Lindvall O, Bjorklund A, Moore RY, Stenevi U (1974). Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res* **81**: 325-331.
- Litten RZ, Egli M, Heilig M, Cui C, Fertig JB, Ryan ML *et al* (2012). Medications development to treat alcohol dependence: a vision for the next decade. *Addict Biol* **17**: 513-527.
- Liu X and Weiss F (2002). Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and role of concurrent activation of corticotropin-releasing factor and opioid mechanisms. *J Neurosci* **22**: 7856-7861.
- Lopez-Moreno JA, Gonzalez-Cuevas G, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M (2004). Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation. *J Neurosci* **24**: 8245-8252.
- Lovinger DM (1997). Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 267-282.
- Lu XY, Churchill L, Kalivas PW (1997). Expression of D1 receptor mRNA in projections from the forebrain to the ventral tegmental area. *Synapse* **25**: 205-214.
- Lucchi L, Bosio A, Spano PF, Trabucchi M (1982). Action of ethanol and salsolinol on opiate receptor function. *Brain Res* **232**: 506-510.
- Ludlow KH, Bradley KD, Allison DW, Taylor SR, Yorgason JT, Hansen DM *et al* (2009). Acute and chronic ethanol modulate dopamine D2-subtype receptor responses in ventral tegmental area GABA neurons. *Alcohol Clin Exp Res* **33**: 804-811.
- Ludwig AM and Wikler A (1974). "Craving" and relapse to drink. *Q J Stud Alcohol* **35**: 108-130.
- Luquiens A, Reynaud M, Aubin HJ (2011). Is controlled drinking an acceptable goal in the treatment of alcohol dependence? A survey of French alcohol specialists. *Alcohol Alcohol* **46**: 586-591.
- Luscher C and Malenka RC (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* **69**: 650-663.
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2004). Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends Neurosci* **27**: 460-467.

References

- Mann K, Kiefer F, Spanagel R, Littleton J (2008). Acamprosate: recent findings and future research directions. *Alcohol Clin Exp Res* **32**: 1105-1110.
- Mann K, Lemenager T, Hoffmann S, Reinhard I, Hermann D, Batra A *et al* (2013). Results of a double-blind, placebo-controlled pharmacotherapy trial in alcoholism conducted in Germany and comparison with the US COMBINE study. *Addict Biol* **18**: 937-946.
- Manrique HM, Miquel M, Aragon CM (2006). Acute administration of 3-nitropropionic acid, a reactive oxygen species generator, boosts ethanol-induced locomotor stimulation. New support for the role of brain catalase in the behavioural effects of ethanol. *Neuropharmacology* **51**: 1137-1145.
- 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.
- March SM, Abate P, Spear NE, Molina JC (2013). The role of acetaldehyde in ethanol reinforcement assessed by Pavlovian conditioning in newborn rats. *Psychopharmacology (Berl)* **226**: 491-499.
- 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.
- Margolis EB, Mitchell JM, Ishikawa J, Hjelmstad GO, Fields HL (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines action potential duration and dopamine D(2) receptor inhibition. *J Neurosci* **28**: 8908-8913.
- Margolis EB, Toy B, Himmels P, Morales M, Fields HL (2012). Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PLoS One* **7**: e42365.
- 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.

References

Marlatt GA (1990). Cue exposure and relapse prevention in the treatment of addictive behaviors. *Addict Behav* **15**: 395-399.

Martin-Fardon R and Weiss F (2013). Modeling relapse in animals. *Curr Top Behav Neurosci* **13**: 403-432.

Maruyama W, Nakahara D, Dostert P, Hashiguchi H, Ohta S, Hirobe M *et al* (1993). Selective release of serotonin by endogenous alkaloids, 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines, (R)- and (S)salsolinol, in the rat striatum; in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett* **149**: 115-118.

Maruyama W, Nakahara D, Ota M, Takahashi T, Takahashi A, Nagatsu T *et al* (1992). N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study. *J Neurochem* **59**: 395-400.

Mason BJ, Ritvo EC, Morgan RO, Salvato FR, Goldberg G, Welch B *et al* (1994). A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the efficacy and safety of oral nalmefene HCl for alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **18**: 1162-1167.

Mason BJ, Salvato FR, Williams LD, Ritvo EC, Cutler RB (1999). A double-blind, placebo-controlled study of oral nalmefene for alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* **56**: 719-724.

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.

Matsubara K, Akane A, Maseda C, Takahashi S, Fukui Y (1985). Salsolinol in the urine of nonalcoholic individuals after long-term moderate drinking. *Alcohol Drug Res* **6**: 281-288.

Matsubara K, Fukushima S, Fukui Y (1987). A systematic regional study of brain salsolinol levels during and immediately following chronic ethanol ingestion in rats. *Brain Res* **413**: 336-343.

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.

McBride WJ, Li TK, Deitrich RA, Zimatkin S, Smith BR, Rodd-Henricks ZA (2002). Involvement of acetaldehyde in alcohol addiction. *Alcohol Clin Exp Res* **26**: 114-119.

References

- McKinzie DL, Li TK, McBride WJ, Slusher BS (2000). NAALADase inhibition reduces alcohol consumption in the alcohol-preferring (P) line of rats. *Addict Biol* **5**: 411-416.
- McLellan AT, Lewis DC, O'Brien CP, Kleber HD (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA* **284**: 1689-1695.
- Melchior CL and Myers RD (1977). Preference for alcohol evoked by tetrahydropapaveroline (THP) chronically infused in the cerebral ventricle of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **7**: 19-35.
- Melis M, Carboni E, Caboni P, Acquas E (2015). Key role of salsolinol in ethanol actions on dopamine neuronal activity of the posterior ventral tegmental area. *Addict Biol* **20**: 182-193.
- Melis M, Diana M, Enrico P, Marinelli M, Brodie MS (2009). Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. *Alcohol* **43**: 531-539.
- 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 and Gessa GL (1984). Ethanol excites dopamine (DA) neurons and inhibits non-dopamine (non-DA) neurons in the Substantia nigra of rats. *Ann Ist Super Sanita* **20**: 11-15.
- Mereu G and Gessa GL (1985). Low doses of ethanol inhibit the firing of neurons in the substantia nigra, pars reticulata: a GABAergic effect? *Brain Res* **360**: 325-330.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015). Encuesta sobre alcohol y drogas en España (2013/2014). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; .
- Mobley A, Linder SK, Braeuer R, Ellis LM, Zwelling L (2013). A survey on data reproducibility in cancer research provides insights into our limited ability to translate findings from the laboratory to the clinic. *PLoS One* **8**: e63221.
- Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004). Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* **431**: 760-767.

References

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.

Morikawa H, Manzoni OJ, Crabbe JC, Williams JT (2000). Regulation of central synaptic transmission by 5-HT(1B) auto- and heteroreceptors. *Mol Pharmacol* **58**: 1271-1278.

Morikawa H and 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.

Mrejeru A, Marti-Prats L, Avegno EM, Harrison NL, Sulzer D (2015). A subset of ventral tegmental area dopamine neurons responds to acute ethanol. *Neuroscience* **290**: 649-658.

Muggironi G, Fois GR, Diana M (2013). Ethanol-derived acetaldehyde: pleasure and pain of alcohol mechanism of action. *Front Behav Neurosci* **7**: 87.

Myers RD and Melchior CL (1977). Differential actions on voluntary alcohol intake of tetrahydroisoquinolines or a beta-carboline infused chronically in the ventricle of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **7**: 381-392.

Myers RD and Oblinger MM (1977). Alcohol drinking in the rat induced by acute intracerebral infusion of two tetrahydroisoquinolines and a beta-carboline. *Drug Alcohol Depend* **2**: 469-483.

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, Marzuki S, Myers RD, Singer G (1984). Alteration of alcohol drinking in the rat by peripherally self-administered acetaldehyde. *Alcohol* **1**: 229-236.

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

References

- Nagasawa HT, Goon DJ, DeMaster EG (1978). 2,5,5-Trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a D(-)-penicillamine-directed pseudometabolite of ethanol. Detoxication mechanism for acetaldehyde. *J Med Chem* **21**: 1274-1279.
- 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.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* **152**: 1024-1031.
- Naoi M, Maruyama W, Dostert P, Kohda K, Kaiya T (1996). A novel enzyme enantioselectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *Neurosci Lett* **212**: 183-186.
- National Institute on Drug Abuse (NIDA) (2014 (Last updated)). Glossary. *National Institute on Drug Abuse (NIDA)* .
- Nature Editorial (2013). Reducing our irreproducibility. *Nature* **496**: 398.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R *et al* (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.
- Neuroactive metabolites of ethanol (2014). **Neuroactive metabolites of ethanol: a behavioral and neurochemical synopsis.** . *Frontiers in behavioral neuroscience*
Research topic: .
- Nicola SM (2007). The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)* **191**: 521-550.
- Nieh EH, Kim SY, Namburi P, Tye KM (2013). Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Res* **1511**: 73-92.
- Nutt DJ (2014). The role of the opioid system in alcohol dependence. *J Psychopharmacol* **28**: 8-22.

References

- Oades RD and Halliday GM (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* **434**: 117-165.
- Okamoto T, Harnett MT, Morikawa H (2006). Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. *J Neurophysiol* **95**: 619-626.
- 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, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ *et al* (2005). Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci* **25**: 5553-5562.
- O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B (1992). Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* **49**: 881-887.
- Orrico A, Hipolito L, Sanchez-Catalan MJ, Marti-Prats L, Zornoza T, Granero L *et al* (2013). Efficacy of D-penicillamine, a sequestering acetaldehyde agent, in the prevention of alcohol relapse-like drinking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **228**: 563-575.
- Orrico A, Marti-Prats L, Cano-Cebrian MJ, Granero L, Polache A, Zornoza T (2014a). Improved effect of the combination naltrexone/D-penicillamine in the prevention of alcohol relapse-like drinking in rats. *J Psychopharmacol* **28**: 76-81.
- Orrico A, Marti-Prats L, Cano-Cebrian MJ, Polache A, Zornoza T, Granero L (2014b). Disposition of d-penicillamine, a promising drug for preventing alcohol-relapse. Influence of dose, chronic alcohol consumption and age: studies in rats. *Biopharm Drug Dispos* **35**: 284-295.
- Oslin DW, Berrettini W, Kranzler HR, Pettinati H, Gelernter J, Volpicelli JR *et al* (2003). A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. *Neuropsychopharmacology* **28**: 1546-1552.
- Oswald LM and Wand GS (2004). Opioids and alcoholism. *Physiol Behav* **81**: 339-358.

References

- Overton PG and Clark D (1997). Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* **25**: 312-334.
- Paez X and 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 and 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.
- Pankseep J (1998): *Affective Neuroscience*.
- Paolucci E, Berretta N, Tozzi A, Bernardi G, Mercuri NB (2003). Depression of mGluR-mediated IPSCs by 5-HT in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci* **18**: 2743-2750.
- Pastor R and Aragon 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, Sanchis-Segura C, Aragon 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, Sanchis-Segura C, Aragon 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.

References

Paxinos G and Watson C (2007): The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Inc: London.

Peana AT and Acquas E (2013). Behavioral and biochemical evidence of the role of acetaldehyde in the motivational effects of ethanol. *Front Behav Neurosci* **7**: 86.

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 *et al* (2008). Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: a conditioned place preference study in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* **32**: 249-258.

Peana AT, Giugliano V, Rosas M, Sabariego M, Acquas E (2013a). Effects of L-cysteine on reinstatement of ethanol-seeking behavior and on reinstatement-elicited extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the rat nucleus accumbens shell. *Alcohol Clin Exp Res* **37 Suppl 1**: E329-37.

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

Peana AT, Muggironi G, Diana M (2010b). Acetaldehyde-reinforcing effects: a study on oral self-administration behavior. *Front Psychiatry* **1**: 23.

Peana AT, Muggironi G, Fois G, Diana M (2013b). Alpha-lipoic acid reduces ethanol self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res* **37**: 1816-1822.

Peana AT, Muggironi G, Fois GR, Zinellu M, Sirca D, Diana M (2012). Effect of (L)-cysteine on acetaldehyde self-administration. *Alcohol* **46**: 489-497.

Perrotti LI, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG *et al* (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* **21**: 2817-2824.

Pessia M, Jiang ZG, North RA, Johnson SW (1994). Actions of 5-hydroxytryptamine on ventral tegmental area neurons of the rat in vitro. *Brain Res* **654**: 324-330.

References

- Phillips TJ and Shen EH (1996). Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *Int Rev Neurobiol* **39**: 243-282.
- 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.
- Piepponen TP, Mikkola JA, Ruotsalainen M, Jonker D, Ahtee L (1999). Characterization of the decrease of extracellular striatal dopamine induced by intrastriatal morphine administration. *Br J Pharmacol* **127**: 268-274.
- Pierce RC and Kalivas PW (1995). Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **275**: 1019-1029.
- Plosker GL (2015). Acamprostate: A Review of Its Use in Alcohol Dependence. *Drugs* **75**: 1255-1268.
- Pohorecky L (1977). Biphasic action of ethanol. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **1**: 231-240.
- Polter AM, Bishop RA, Briand LA, Graziane NM, Pierce RC, Kauer JA (2014). Poststress block of kappa opioid receptors rescues long-term potentiation of inhibitory synapses and prevents reinstatement of cocaine seeking. *Biol Psychiatry* **76**: 785-793.
- Purvis PL, Hirst M, Baskerville JC (1980). Voluntary ethanol consumption in the rat following peripheral administrations of 3-carboxy-salsolinol. *Subst Alcohol Actions Misuse* **1**: 439-445.
- Quertemont E and De Witte P (2001). Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav* **68**: 449-454.
- Quertemont E and Tambour S (2004). Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends Pharmacol Sci* **25**: 130-134.
- Quertemont E, Tambour S, Tirelli E (2005). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol* **75**: 247-274.
- 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.

References

- Quintanilla ME, Rivera-Meza M, Berrios-Carcamo P, Cassels BK, Herrera-Marschitz M, Israel Y (2015). (R)-Salsolinol, a product of ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake. *Addict Biol* .
- Quintanilla ME, Rivera-Meza M, Berrios-Carcamo PA, Bustamante D, Buscaglia M, Morales P *et al* (2014). Salsolinol, free of isosalsolinol, exerts ethanol-like motivational/sensitization effects leading to increases in ethanol intake. *Alcohol* **48**: 551-559.
- Quintanilla ME and Tampier L (2003). Acetaldehyde-reinforcing effects: differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats. *Alcohol* **31**: 63-69.
- Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK (2001). Research advances in ethanol metabolism. *Pathol Biol (Paris)* **49**: 676-682.
- Raskin NH (1975). Editorial: Alcoholism or acetaldehydism? *N Engl J Med* **292**: 422-423.
- Raskin NH and Sokoloff L (1970). Adaptation of alcohol dehydrogenase activity in brain to chronic ethanol ingestion. *Neurology* **20**: 391-392.
- 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.
- Ray LA and Hutchison KE (2007). Effects of naltrexone on alcohol sensitivity and genetic moderators of medication response: a double-blind placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry* **64**: 1069-1077.
- Reddy BV, 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.
- Reddy BV and 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.
- Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J (2009). Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* **373**: 2223-2233.

References

- Rehm J and Shield KD (2013). Global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis, and injury in 2010. *Alcohol Res* **35**: 174-183.
- Rehm J, Zatonksi W, Taylor B, Anderson P (2011). Epidemiology and alcohol policy in Europe. *Addiction* **106 Suppl 1**: 11-19.
- Reilly MT, Noronha A, Warren K (2014). Perspectives on the neuroscience of alcohol from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. *Handb Clin Neurol* **125**: 15-29.
- Rodd ZA, Bell RL, McKinzie DL, Webster AA, Murphy JM, Lumeng L *et al* (2004a). 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 ZA, Bell RL, Sable HJ, Murphy JM, McBride WJ (2004b). Recent advances in animal models of alcohol craving and relapse. *Pharmacol Biochem Behav* **79**: 439-450.
- Rodd ZA, Bell RL, Zhang Y, Goldstein A, Zaffaroni A, McBride WJ *et al* (2003). Salsolinol produces reinforcing effects in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol Clin Exp Res* **27**: 440-449.
- Rodd ZA, Bell RL, Zhang Y, Murphy JM, Goldstein A, Zaffaroni A *et al* (2005). Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology* **30**: 330-338.
- Rodd ZA, Oster SM, Ding ZM, Toalston JE, Deehan G, Bell RL *et al* (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-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.
- 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.

References

- Rojkovicova T, Mechref Y, Starkey JA, Wu G, Bell RL, McBride WJ *et al* (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.
- Rommelspacher H, Sllstrom Baum S, Dufeu P, Schmidt LG (1995). Determination of (R)- and (S)-salsolinol sulfate and dopamine sulfate levels in plasma of nonalcoholics and alcoholics. *Alcohol* **12**: 309-315.
- Roozen HG, de Waart R, van der Windt DA, van den Brink W, de Jong CA, Kerkhof AJ (2006). A systematic review of the effectiveness of naltrexone in the maintenance treatment of opioid and alcohol dependence. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**: 311-323.
- 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.
- Rosner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Vecchi S, Srisurapanont M, Soyka M (2010). Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev* **(12):CD001867**. doi: CD001867.
- Roth-Deri I, Zangen A, Aleli M, Goelman RG, Pelled G, Nakash R *et al* (2003). Effect of experimenter-delivered and self-administered cocaine on extracellular beta-endorphin levels in the nucleus accumbens. *J Neurochem* **84**: 930-938.
- Salamone JD (2007). Functions of mesolimbic dopamine: changing concepts and shifting paradigms. *Psychopharmacology (Berl)* **191**: 389.
- Salimov RM and Salimova NB (1993). The alcohol-deprivation effect in hybrid mice. *Drug Alcohol Depend* **32**: 187-191.
- Samson HH and Doyle TF (1985). Oral ethanol self-administration in the rat: effect of naloxone. *Pharmacol Biochem Behav* **22**: 91-99.
- Samson HH, Sharpe AL, Denning C (1999). Initiation of ethanol self-administration in the rat using sucrose substitution in a sipper-tube procedure. *Psychopharmacology (Berl)* **147**: 274-279.
- Sanchez-Catalan MJ, Hipolito L, Guerri C, Granero L, Polache A (2008). Distribution and differential induction of CYP2E1 by ethanol and acetone in the mesocorticolimbic system of rat. *Alcohol Alcohol* **43**: 401-407.

References

- Sanchez-Catalan MJ, Hipolito L, Zornoza T, Polache A, Granero L (2009). Motor stimulant effects of ethanol and acetaldehyde injected into the posterior ventral tegmental area of rats: role of opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **204**: 641-653.
- Sanchez-Catalan MJ, Kaufling J, Georges F, Veinante P, Barrot M (2014). The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* **282C**: 198-216.
- Sanchis-Segura C and Aragon CM (2002). Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion. *Drug Alcohol Depend* **68**: 189-194.
- Sanchis-Segura C, Correa M, Aragon 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.
- Sanchis-Segura C, Correa M, Miquel M, Aragon CM (2005). Catalase inhibition in the Arcuate nucleus blocks ethanol effects on the locomotor activity of rats. *Neurosci Lett* **376**: 66-70.
- Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CM (1999a). Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: is there a functional link? *Psychopharmacology (Berl)* **144**: 83-89.
- Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CM (1999b). Daily injections of cyanamide enhance both ethanol-induced locomotion and brain catalase activity. *Behav Pharmacol* **10**: 459-465.
- Sanchis-Segura C and Spanagel R (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* **11**: 2-38.
- Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* **80**: 1-27.
- Schulz R, Wuster M, Duka T, Herz A (1980). Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology (Berl)* **68**: 221-227.
- Semba K and 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.

References

Serrano E, Pozo OJ, Beltrán J, Hernández F, Font L, Miquel M *et al* (2007). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4 S,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 and 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.

Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)* **168**: 3-20.

Shen XY, Orson FM, Kosten TR (2012). Vaccines against drug abuse. *Clin Pharmacol Ther* **91**: 60-70.

Siggins GR, Roberto M, Nie Z (2005). The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol. *Pharmacol Ther* **107**: 80-98.

Sinclair JD (2001). Evidence about the use of naltrexone and for different ways of using it in the treatment of alcoholism. *Alcohol Alcohol* **36**: 2-10.

Sinclair JD and Li TK (1989). Long and short alcohol deprivation: effects on AA and P alcohol-preferring rats. *Alcohol* **6**: 505-509.

Sinclair JD and Lindros KO (1981). Suppression of alcohol drinking with brain aldehyde dehydrogenase inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* **14**: 377-383.

Sinclair JD and Senter RJ (1968). Development of an alcohol-deprivation effect in rats. *Q J Stud Alcohol* **29**: 863-867.

Sinclair JD and Sheaff B (1973). A negative alcohol-deprivation effect in hamsters. *Q J Stud Alcohol* **34**: 71-77.

Sippel HW (1974). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *J Neurochem* **23**: 451-452.

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**: 862-869.

References

- Sjoquist B, Eriksson A, Winblad B (1982a). Brain salsolinol levels in alcoholism. *Lancet* **1**: 675-676.
- Sjoquist B, Liljequist S, Engel J (1982b). Increased salsolinol levels in rat striatum and limbic forebrain following chronic ethanol treatment. *J Neurochem* **39**: 259-262.
- Skolnick P and Volkow ND (2012). Addiction therapeutics: obstacles and opportunities. *Biol Psychiatry* **72**: 890-891.
- Smith BR, Amit Z, Splawinsky J (1984). Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* **1**: 193-195.
- Smolen TN and Collins AC (1984). Behavioral effects of ethanol and salsolinol in mice selectively bred for acute sensitivity to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* **20**: 281-287.
- Socaransky SM, Aragon CM, Amit Z, Blander A (1984). Higher correlation of ethanol consumption with brain than liver aldehyde dehydrogenase in three strains of rats. *Psychopharmacology (Berl)* **84**: 250-253.
- Soyka M (2013). Review: In alcohol use disorders, acamprosate is more effective for inducing abstinence while naltrexone is more effective for reducing heavy drinking and craving. *Evid Based Ment Health* **16**: 71-2013-101304. Epub 2013 Apr 20.
- Soyka M and Lieb M (2015). Recent Developments in Pharmacotherapy of Alcoholism. *Pharmacopsychiatry* **48**: 123-135.
- Soyka M and Rosner S (2008). Opioid antagonists for pharmacological treatment of alcohol dependence - a critical review. *Curr Drug Abuse Rev* **1**: 280-291.
- Spanagel R (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**: 507-518.
- Spanagel R (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* **89**: 649-705.
- Spanagel R (2000). Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health* **24**: 124-131.

References

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.

Spanagel R and Holter SM (1999). Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: an animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol* **34**: 231-243.

Spanagel R and Holter SM (2000). Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J Neural Transm* **107**: 669-680.

Spanagel R and Kiefer F (2008). Drugs for relapse prevention of alcoholism: ten years of progress. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 109-115.

Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone MC *et al* (2005). The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat Med* **11**: 35-42.

Spanagel R and Vengeliene V (2013). New pharmacological treatment strategies for relapse prevention. *Curr Top Behav Neurosci* **13**: 583-609.

Spanagel R, Vengeliene V, Jandeleit B, Fischer WN, Grindstaff K, Zhang X *et al* (2014). Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium. *Neuropsychopharmacology* **39**: 783-791.

Spanagel R and Zieglgansberger W (1997). Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 54-59.

Spina L, Longoni R, Vinci S, Ibba F, Peana AT, Muggironi G *et al* (2010). Role of dopamine D1 receptors and extracellular signal regulated kinase in the motivational properties of acetaldehyde as assessed by place preference conditioning. *Alcohol Clin Exp Res* **34**: 607-616.

Spivak K, Aragon CM, Amit Z (1987). Alterations in brain aldehyde dehydrogenase activity modify the locomotor effects produced by ethanol in rats. *Alcohol Drug Res* **7**: 481-491.

Srisurapanont M and Jarusuraisin N (2005a). Naltrexone for the treatment of alcoholism: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol* **8**: 267-280.

References

- Srisurapanont M and Jarusuraisin N (2005b). Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev* **(1)**: CD001867.
- 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. *Anal Chem* 3342-3347.
- Steckler T (2015). Preclinical data reproducibility for R&D--the challenge for neuroscience. *Psychopharmacology (Berl)* **232**: 317-320.
- Steffensen SC, Nie Z, Criado JR, Siggins GR (2000). Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate responses involves presynaptic gamma-aminobutyric acid(B) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 637-647.
- Steffensen SC, Stobbs SH, Colago EE, Lee RS, Koob GF, Gallegos RA *et al* (2006). Contingent and non-contingent effects of heroin on mu-opioid receptor-containing ventral tegmental area GABA neurons. *Exp Neurol* **202**: 139-151.
- Steffensen SC, Walton CH, Hansen DM, Yorgason JT, Gallegos RA, Criado JR (2009). Contingent and non-contingent effects of low-dose ethanol on GABA neuron activity in the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* **92**: 68-75.
- Steketee JD and Kalivas PW (1990). Effect of microinjections of apamin into the A10 dopamine region of rats: a behavioral and neurochemical analysis. *J Pharmacol Exp Ther* **254**: 711-719.
- Stewart J (2000). Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci* **25**: 125-136.
- Stobbs SH, Ohran AJ, Lassen MB, Allison DW, Brown JE, Steffensen SC (2004). Ethanol suppression of ventral tegmental area GABA neuron electrical transmission involves N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: 282-289.
- Stuber GD, Hnasko TS, Britt JP, Edwards RH, Bonci A (2010). Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. *J Neurosci* **30**: 8229-8233.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T *et al* (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* **18**: 4588-4602.

References

- Svingos AL, Garzon M, Colago EE, Pickel VM (2001). Mu-opioid receptors in the ventral tegmental area are targeted to presynaptically and directly modulate mesocortical projection neurons. *Synapse* **41**: 221-229.
- 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.
- Takayama S and Uyeno ET (1985). Intravenous self-administration of ethanol and acetaldehyde by rats. *Yakubutsu Seishin Kodo* **5**: 329-334.
- Tambour S, Closon C, Tirelli E, Quertemont E (2007). Effects of cyanamide and acetaldehyde accumulation on the locomotor stimulant and sedative effects of ethanol in mice. *Behav Pharmacol* **18**: 777-784.
- Tampier L and 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 and Mardones J (1986). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on ethanol blood levels after intraperitoneal administration. *Alcohol* **3**: 181-183.
- Tampier L and Quintanilla ME (2005). Saccharin consumption and the effect of a long-term exposure to a sweetened alcoholic solution in high- (UChB) and low- (UChA) alcohol-drinking rats. *Alcohol* **37**: 47-52.
- Tampier L, Quintanilla ME, Karahanian E, Rivera-Meza M, Herrera-Marschitz M, Israel Y (2013). The alcohol deprivation effect: marked inhibition by anticatalase gene administration into the ventral tegmental area in rats. *Alcohol Clin Exp Res* **37**: 1278-1285.
- The Ventral Tegmentum and Dopamine (2014). The Ventral Tegmentum and Dopamine: A New Wave of Diversity. *Neuroscience* **282**: 1-258.
- Theile JW, Morikawa H, Gonzales RA, Morrisett RA (2008). Ethanol enhances GABAergic transmission onto dopamine neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Alcohol Clin Exp Res* **32**: 1040-1048.

References

- Theile JW, Morikawa H, Gonzales RA, Morrisett RA (2011). GABAergic transmission modulates ethanol excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. *Neuroscience* **172**: 94-103.
- Theile JW, Morikawa H, Gonzales RA, Morrisett RA (2009). Role of 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors in Ca²⁺-dependent ethanol potentiation of GABA release onto ventral tegmental area dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **329**: 625-633.
- Truitt EB and Walsh MJ (1971). The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. *The Biology of Alcoholism*, eds. B. Kissin and H. Begleiter (New York, NY: Plenum Press) 161-195.
- Tsai C (1925). The optic tracts and centers of the opossum, *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* **39**: 173-216.
- Ungless MA and Grace AA (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends Neurosci* **35**: 422-430.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004). Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* **19**: 1826-1836.
- Van Bockstaele EJ and Pickel VM (1995). GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* **682**: 215-221.
- Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol* **154**: 299-315.
- Vengeliene V, Bilbao A, Spanagel R (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol* **48**: 313-320.
- Vetulani J, Nalepa I, Antkiewicz-Michaluk L, Sansone M (2001). Opposite effect of simple tetrahydroisoquinolines on amphetamine- and morphine-stimulated locomotor activity in mice. *J Neural Transm* **108**: 513-526.
- 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.

References

- Vick KA, 4th, Guidi M, Stackman RW, Jr (2010). In vivo pharmacological manipulation of small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels influences motor behavior, object memory and fear conditioning. *Neuropharmacology* **58**: 650-659.
- Vinci S, Ibba F, Longoni R, Spina L, Spiga S, Acquas E (2010). Acetaldehyde elicits ERK phosphorylation in the rat nucleus accumbens and extended amygdala. *Synapse* **64**: 916-927.
- Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP (1992). Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* **49**: 876-880.
- Wackernah RC, Minnick MJ, Clapp P (2014). Alcohol use disorder: pathophysiology, effects, and pharmacologic options for treatment. *Subst Abuse Rehabil* **5**: 1-12.
- Walker BM and Koob GF (2008). Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology* **33**: 643-652.
- 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.
- Walsh MJ, Davis VE, Yamanaka Y (1970). Tetrahydropapaveroline: an alkaloid metabolite of dopamine in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **174**: 388-400.
- Wang W, Ameno K, Jamal M, Kumihashi M, Uekita I, Ameno S *et al* (2007). Effect of direct infusion of acetaldehyde on dopamine and dopamine-derived salsolinol in the striatum of free-moving rats using a reverse microdialysis technique. *Organ Toxicity and Mechanisms* **81**: 121-126.
- Ward SJ, Portoghese PS, Takemori AE (1982). Pharmacological characterization in vivo of the novel opiate, beta-funaltrexamine. *J Pharmacol Exp Ther* **220**: 494-498.
- 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.
- Weiner JL and Valenzuela CF (2006). Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice. *Pharmacol Ther* **111**: 533-554.
- Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 250-258.

References

- Wickens JR, Reynolds JN, Hyland BI (2003). Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 685-690.
- Wise RA (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* **36**: 229-240.
- Wise RA (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**: 483-494.
- Wise RA and Bozarth MA (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* **94**: 469-492.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 61-79.
- Wolffgramm J and Heyne A (1991). Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. *Pharmacol Biochem Behav* **38**: 389-399.
- World Health Organization (2014 ed). Global status report on alcohol and health.
- World Health Organization (1994). Lexicon of Alcohol and Drug Terms. **Editado por Organización Mundial de la Salud en 1994 bajo el título Lexicon of Alcohol and Drug Terms: .**
- Xiao C, Shao XM, Olive MF, Griffin WC, 3rd, Li KY, Krnjevic K *et al* (2009). Ethanol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **34**: 307-318.
- Xiao C and 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 C, Zhou C, Li K, Davies DL, Ye JH (2008). Purinergic type 2 receptors at GABAergic synapses on ventral tegmental area dopamine neurons are targets for ethanol action. *J Pharmacol Exp Ther* **327**: 196-205.

References

Xie G, Hipolito L, Zuo W, Polache A, Granero L, Krnjevic K *et al* (2012). Salsolinol stimulates dopamine neurons in slices of posterior ventral tegmental area indirectly by activating mu-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **341**: 43-50.

Xie G, Krnjevic K, Ye JH (2013). Salsolinol modulation of dopamine neurons. *Front Behav Neurosci* **7**: 52.

Xie G and Ye JH (2012). Salsolinol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the posterior ventral tegmental area of rats. *PLoS One* **7**: e36716.

Yamanaka Y, Walsh MJ, Davis VE (1970). Salsolinol, an alkaloid derivative of dopamine formed in vitro during alcohol metabolism. *Nature* **227**: 1143-1144.

Yan QS, Reith ME, Jobe PC, Dailey JW (1996). Focal ethanol elevates extracellular dopamine and serotonin concentrations in the rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol* **301**: 49-57.

Yan QS, Zheng SZ, Feng MJ, Yan SE (2005). Involvement of 5-HT1B receptors within the ventral tegmental area in ethanol-induced increases in mesolimbic dopaminergic transmission. *Brain Res* **1060**: 126-137.

Ye JH, Tao L, Ren J, Schaefer R, Krnjevic K, Liu PL *et al* (2001). Ethanol potentiation of glycine-induced responses in dissociated neurons of rat ventral tegmental area. *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 77-83.

Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* **282**: 23-48.

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.

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

Zhao-Shea R, Liu L, Soll LG, Improgo MR, Meyers EE, McIntosh JM *et al* (2011). Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* **36**: 1021-1032.

Zimatkin SM (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J Neurochem* **56**: 1-11.

References

- Zimatkin SM and Lindros KO (1996). Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol* **31**: 167-174.
- Zimatkin SM, Liopo AV, Deitrich RA (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* **22**: 1623-1627.
- 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, Rout UK, Koivusalo M, Buhler R, Lindros KO (1992). Regional distribution of low-K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* **16**: 1162-1167.
- Zindel LR and Kranzler HR (2014). Pharmacotherapy of alcohol use disorders: seventy-five years of progress. *J Stud Alcohol Drugs Suppl* **75 Suppl 17**: 79-88.
- Zornoza T, Cano MJ, Polache A, Granero L (2003). Pharmacology of Acamprosate: An Overview. *CNS drug reviews* **9**: 359-374.

