

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**DETECCIÓN DE ADUCTOS DE PROTEÍNA-ACETALDEHÍDO  
COMO MEDIDA INDIRECTA DE LOS NIVELES DE ACETALDEHÍDO  
GENERADOS EN CEREBRO DE RATA POR UNA  
ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ALCOHOL**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Toxicológica y  
Diagnóstico Molecular, y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***MARIANNE BUSCAGLIA FERNÁNDEZ***

**Directores de Tesis:**

**Dr. Yedy Israel Jacard y Dra. Paola Morales Retamales**

**Santiago-CHILE**

**Enero 2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**MARIANNE BUSCAGLIA FERNÁNDEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dr. Yedy Israel J.**

---

**Dra. Paola Morales R.**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Marcelo Kogan B. (Presidente)**

---

**Dra. María Elena Quintanilla**

---

**Dr. Hernán Lara P.**

---

**Para mi mamá y para mi papá.**

**Por mi Nani y por mi abuelita Raquel.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante esta tesis, y también durante mi paso por la Universidad, muchos caminaron conmigo, dándome su apoyo y cariño para lograr este proyecto. Hoy, agradezco profundamente:

Al Dr. Yedy Israel, por enseñarme consiguiendo un equilibrio perfecto entre la libertad de hacer y pensar, y la guía que aún necesita un estudiante; principalmente, por hacerme sentir que siempre que tocara su puerta me encontraría con su buena disposición y amabilidad. A la Dra. María Elena Quintanilla, por estar cada día a mi lado, preocupándose desde mis experimentos hasta de mis dolores de guatita, desde el acetaldehído hasta de esconderme huevitos de pascua en el estuche. Estoy inmensamente agradecida de como me acogió en su laboratorio, y de cómo me cuidó estos años. A Mario, por tu compañía diaria, a la Dra. Lutske Tampier y a don Juan Santibáñez, por su amabilidad cada vez que necesité ayuda. A la Dra. Amalia Sapag, Pablo, Catalina, Benjamín y Carlos, por cada miércoles de ciencia, de discusión y de risas. A la Dra. Paola Morales, a la Sra. Carmen Almeyda y al Dr. Mario Herrera-Marschitz, por permitirme ser parte de su laboratorio y prestarme ayuda experimental cada vez que lo pedí.

A mis amigos Cristian H. (Grillo), Sebastián Q. (Quintremil), Bernardo P. (Berni), Damián G., Fernando A. (Feña) y Valentina D. (Vale), por tantos buenos momentos compartidos, por las risas, por las noches de estudio interminables. Probablemente la universidad habría sido mucho más difícil y aburrida sin ustedes. Muy especialmente a mi amigo Pablo M., gracias por cuidarme en las malas y por reír conmigo en las buenas.

A Camila (Piojo), Bárbara (Bbto), Rayén, Macarena (Maca), Mariano, Javiere (Delpi) y Pía, mis amigos de siempre. Por cada conversación hasta el amanecer, por siempre estar ahí. Al final de este viaje seguimos sonriendo, los quiero tanto.

A Francisco, mi corbatita. Tu amor me dio fuerza cada vez que la necesité. Gracias por ser mi gran compañero durante esta etapa, por el día a día, por escuchar incluso mis largas historias de luchas experimentales.

A Felipe, mi hermanito. Por ser mi fan número uno, siempre motivándome a tocar las estrellas.  
A Stefano, mi hermanito. Tus cantos desde la otra pieza alegraron mis días. A Vincenzo, mi bebé hermoso, por tu alegría, tus saltos, tu compañía incondicional.

A mis papis, por amarme como su hija. No muchos contamos con la suerte de haber tenido dos mamás y dos papás. Mi vida tiene tanto de ustedes, haber llegado hasta acá se debe en gran parte a sus enseñanzas y a su amor.

A mi abuelita, Raquel Rojas. El salto desde el salitre a la universidad es gracias a ti, estoy segura que desde arriba cuidas cada uno de mis pasos.

A mi Nani, Primitivo Fernández. Por nuestro amor infinito, por la dulzura de tus enseñanzas, porque eres y serás siempre la persona favorita de mi corazón.

Principalmente, a mis papás. Su amor... su inmenso amor que llena y que consigue todo por sus hijos. Nada es tan difícil si ustedes están a mi lado. Esto, es de ustedes.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Farmacogenética del Alcoholismo (Programa de Farmacología Clínica y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) y en el Laboratorio de Farmacoterapia Génica (Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) y fue financiada por los proyectos **FONDECYT 1095021** (Yedy Israel J.), **1110263** (Paola Morales R.), **1120079** (Mario Herrera M.).

La presente tesis de magíster y memoria de título ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**Buscaglia M.,** Quintanilla M.E., Rivera-Meza M., Herrera-Marschitz M., Morales P., Israel Y. (2012) Acetaldehyde as a mediator of ethanol reinforcement: Determination of acetaldehyde levels formed *in vivo* in the brain and in the ventral tegmental area of rat following acute ethanol administration. II International Workshop “Motivated Behaviors, Stress and Addiction: from Molecules to Behavior”. Poster session. Valparaíso, Chile, 15-17 de Noviembre de 2012.

**Buscaglia M.,** Quintanilla M.E., Rivera-Meza M., Herrera-Marschitz M., Morales P., Israel Y. (2012) Acetaldehyde as a mediator of ethanol reinforcement: Determination of acetaldehyde levels formed *in vivo* in the brain of rat following acute ethanol administration. XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile, 2-5 de Octubre de 2012.

**Buscaglia M.,** Quintanilla M.E., Rivera-Meza M., Herrera-Marschitz M., Morales P., Israel Y. (2012) Determinación de niveles de acetaldehído generados *in vivo* en el área del tegmento ventral de rata por la administración aguda de etanol. II Congreso de Ciencia Joven. Sesión de pósters. Santiago, Chile, 6 de Septiembre de 2012.

**Buscaglia M.,** Quintanilla M.E., Rivera-Meza M., Morales P., Israel Y. (2011) Etanol como prodroga: estimación de los niveles de acetaldehído en el sistema dopaminérgico mesolímbico de rata luego de una administración aguda de etanol. I Congreso de Ciencia Joven. Sesión de pósters. Santiago, Chile. 8 de Septiembre de 2011.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Alcohol: aspectos generales.....	3
1.1.1. Dependencia del alcohol.....	3
1.1.2. Metabolismo del etanol: periferia vs sistema nervioso central .....	4
1.1.3. Catalasa como vía principal de metabolización del etanol a nivel cerebral.....	7
1.2. Etanol como pro-droga: rol que tendría el acetaldehído y la importancia de la catalasa en el efecto reforzante del etanol .....	8
1.3. El problema de medir acetaldehído <i>in vivo</i> a nivel cerebral.....	11
1.4. Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de acetaldehído .....	11
1.5. Propuesta de investigación .....	13
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	14
2.1. HIPÓTESIS .....	14
2.2. OBJETIVO GENERAL .....	14
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. MATERIALES</b> .....	15
3.1. Animales.....	15
3.2. Reactivos .....	15
3.2.1. Anticuerpos.....	15
3.2.2. Reactivos generales.....	15
<b>4. MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Determinación de condiciones de uso de NaCNBH <sub>3</sub> como agente estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído ( <i>in vitro</i> ) .....	16
4.2. Evaluación de la administración estereotóxica de NaCNBH <sub>3</sub> en el área del tegmento ventral (VTA) o intracerebroventricular (ICV) para estudios de estabilización de aductos de proteína-acetaldehído formados <i>in vivo</i> en el cerebro total de ratas, luego de una dosis de etanol 2 g/kg i.p. ....	20



4.3.	Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de niveles de acetaldehído presentes en un tejido .....	23
4.4.	Estimación de los niveles de acetaldehído alcanzados <i>in vivo</i> en cerebro total y VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p.....	25
4.5.	Competencia entre la formación de aductos de proteína-acetaldehído y la formación de salsolinol en homogeneizados de cerebro que se les agrega dopamina, NaCNBH <sub>3</sub> y acetaldehído .....	25
4.6.	Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	26
4.7.	Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído estables.....	26
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
5.1.	Determinación de condiciones de uso de NaCNBH <sub>3</sub> como estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído ( <i>in vitro</i> ) .....	28
5.1.1.	Determinación de la concentración de NaCNBH <sub>3</sub> que permite la formación de aductos estables (estabilización <i>ex vivo</i> ) .....	28
5.1.2.	Evaluación del efecto del NaCNBH <sub>3</sub> 0,5 mM en la formación cerebral de acetaldehído a partir de etanol ( <i>in vitro</i> ) .....	30
5.1.3.	Estimación del tiempo en que el NaCNBH <sub>3</sub> 0,5 mM permite la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído ( <i>in vitro</i> ).....	31
5.1.4.	Evaluación de la posible saturación de las proteínas cerebrales para formar aductos estables con el acetaldehído ( <i>in vitro</i> ) .....	33
5.2.	Evaluación de la vía de administración del NaCNBH <sub>3</sub> para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados <i>in vivo</i> en el cerebro de ratas luego de una dosis aguda de etanol.....	33
5.2.1.	Evaluación de la administración estereotáxica de NaCNBH <sub>3</sub> intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados <i>in vivo</i> en el cerebro total de ratas luego de una dosis de etanol 2 g/kg i.p.....	35
5.2.2.	Evaluación de la administración estereotáxica de NaCNBH <sub>3</sub> intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados <i>in vivo</i> en el núcleo accumbens de ratas luego de una dosis aguda de etanol 2 g/kg i.p.....	37
5.3.	Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de niveles de acetaldehído presentes en un tejido .....	39

5.4.	Estimación de los niveles del acetaldehído alcanzados <i>in vivo</i> en el cerebro total y VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p. ....	42
5.5.	Competencia entre la formación de aductos de proteína-acetaldehído y la formación de salsolinol en homogeneizados de cerebro que se les agrega dopamina, NaCNBH <sub>3</sub> y acetaldehído .....	46
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
6.1.	Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de acetaldehído .....	48
6.2.	Detección del acetaldehído formado <i>in vivo</i> en el cerebro de rata por una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p. ....	51
6.3.	Estimación de niveles de acetaldehído que se encuentran <i>in vivo</i> en el cerebro de ratas, luego de una dosis de etanol 1 g/kg i.p. ....	52
6.4.	Competencia entre la formación de aductos y la formación de salsolinol como explicación de la ausencia de aductos en el VTA de ratas tratadas con etanol reforzante .....	53
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>56</b>

## RESUMEN

Estudios muestran que el efecto reforzante del alcohol estaría mediado por su metabolito primario, el acetaldehído. Esta molécula actuaría estimulando al sistema de recompensa, formado por neuronas dopaminérgicas que se localizan en el área del tegmento ventral (VTA) y se proyectan hacia el núcleo accumbens (sistema dopaminérgico mesolímbico). Se ha visto que ratas se autoadministran acetaldehído  $6 - 90 \mu\text{M}$  en el VTA, por lo que éste sería el rango de concentraciones reforzantes para los animales. Sin embargo, no se sabe si al administrar a ratas una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.), se alcanza una concentración reforzante de acetaldehído en sus VTA, pues tampoco se ha detectado la generación de acetaldehído a nivel cerebral, probablemente porque su rápida metabolización dificulta su detección.

El objetivo de este estudio fue establecer una técnica que permita: (a) detectar el acetaldehído que se forma *in vivo* en el cerebro y específicamente en el sistema dopaminérgico mesolímbico luego de una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.), y (b) estimar los niveles de acetaldehído que se encuentran en el cerebro total y en el VTA, luego de una dosis altamente reforzante de etanol (1 g/kg i.p.). Para esto, se aprovechó la propiedad del acetaldehído de formar aductos con proteínas, los que al ser estabilizados por reducción, son detectables por un anti-suero que permite indirectamente la medición de acetaldehído. Así, se logró la detección por Western blot de aductos estables formados *in vivo* en el cerebro, y específicamente en el núcleo accumbens de rata, luego de una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p.. Para estimar la concentración de acetaldehído que se encuentra en el cerebro de rata por una dosis de etanol 1 g/kg i.p., se cuantificaron los aductos formados, y en paralelo se obtuvo una curva estándar que relaciona concentraciones conocidas de acetaldehído agregadas a homogeneizados de cerebro con la cantidad de aductos de proteína-acetaldehído formados. La concentración promedio de acetaldehído que se encontró en el cerebro total de rata fue de  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5), concentración que si se encontrara en el VTA generaría refuerzo en los animales. Sin embargo, en el VTA no se detectaron aductos estables luego de una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p.. Esto sería explicado porque el VTA es altamente dopaminérgico, y el acetaldehído formado en esta zona puede condensar con la dopamina formando salsolinol, reacción que ocurriría más rápido que la formación de aductos estables. El salsolinol se ha postulado como el efector final del efecto reforzante causado por el etanol.

## SUMMARY

Several studies suggest that the reinforcing effect of ethanol would be mediated by its first metabolite, acetaldehyde. This molecule would act by stimulating the reward system, formed by dopaminergic neurons localized in the ventral tegmental area (VTA) projecting to the nucleus accumbens (dopaminergic mesolimbic system). Rats self-administer acetaldehyde 6 - 90  $\mu\text{M}$  in the VTA, so this would be the range of reinforcing concentrations. Nevertheless, it is not known whether ethanol administered to rats in a reinforcing dose (1 or 2 g/kg i.p.) produce a concentration of acetaldehyde in the VTA that allows reinforcement, since acetaldehyde generation has never been detected probably because its rapid metabolism produce difficulty in its detection.

The purpose of the present study was to establish a technique that allows: (a) to detect the acetaldehyde formed *in vivo* in total brain and specifically in the dopaminergic mesolimbic system after a reinforcing dose of ethanol (1 or 2 g/kg i.p.), and (b) to estimate acetaldehyde levels formed in total brain and in the VTA after a highly reinforcing dose of ethanol (1 g/kg i.p.). For this, we took advantage of the acetaldehyde property to interact with proteins forming adducts, that when are stabilized for reduction, are detectable by an anti-serum that allows the indirect measure of acetaldehyde. In this way, we detect by Western blot stable adducts formed *in vivo* in the brain, and specifically in the nucleus accumbens of rat, after a dose of ethanol 1 or 2 g/kg i.p.. To estimate acetaldehyde concentration reached in the total brain of rat after a dose of ethanol 1 g/kg i.p., the adducts formed were quantified and, in parallel, was obtained a standard curve that relates known acetaldehyde concentrations added to brain homogenates with the quantity of adducts formed. The mean concentration of acetaldehyde that was formed in the total brain of rat after a dose of ethanol 1 g/kg i.p. was estimated to be  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5). If this concentration was found in the VTA, it could generate reinforcement in this rats. Nevertheless, no adducts were found in the VTA after a dose of ethanol 1 or 2 g/kg i.p. This could be explained because the VTA contains dopaminergic neurons, and the acetaldehyde formed in this zone could condensate with dopamine forming salsolinol, reaction that can occur more quickly that the formation of stable adducts. Salsolinol has been proposed to be the final effector of the reinforcing properties of ethanol.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Alcohol: aspectos generales**

#### **1.1.1. Dependencia del alcohol**

Aunque el consumo moderado de alcohol tiene efectos cardiovasculares benéficos para la salud, el abuso de alcohol provoca un daño serio tanto en el organismo como en el ámbito social. La dependencia del alcohol es una enfermedad crónica asociada a un conjunto de fenómenos conductuales, cognitivos y fisiológicos en la cual el uso del alcohol adquiere la máxima prioridad para el individuo, mayor incluso que cualquier otro tipo de comportamiento que en el pasado hubiera tenido el valor más alto (ICD-10, 2010). Las manifestaciones características del síndrome de dependencia del alcohol son: (i) el deseo intenso de ingerir alcohol, (ii) una disminución de la capacidad de controlar el consumo de alcohol, (iii) síntomas somáticos de abstinencia cuando el consumo de alcohol se reduce o cesa, (iv) tolerancia frente al consumo de alcohol, (v) abandono progresivo de otras fuentes de placer o diversión a causa del consumo de la sustancia y (vi) persistencia en el consumo de la sustancia, a pesar de sus evidentes consecuencias perjudiciales (ICD-10, 2010). El alcohol es el primer factor de riesgo de enfermedad y muerte prematura, siendo más importante incluso que otros factores como el tabaquismo, la hipercolesterolemia, el sobrepeso, la desnutrición y los problemas de saneamiento (OMS, 2008). En Chile, de los casi 5 millones de personas estimadas como consumidores de alcohol, cerca del 12% presenta dependencia alcohólica (CONACE, 2003). La mortalidad específica por cirrosis hepática es de 20,8 por 100.000 habitantes, siendo una de las tasas más altas de Latinoamérica, y además, el alcoholismo es responsable del 7% de las muertes como causa principal y del 25% de las muertes como causa asociada.

La dependencia que provocan las drogas de abuso puede ser atribuida al refuerzo positivo que provocan en los consumidores. La propiedad reforzante intrínseca de una droga se refiere que éstas son capaces de aumentar la probabilidad de que los consumidores vuelvan a administrarse esa droga (Self y Nestler, 1995). El mecanismo a través del cual el etanol genera este refuerzo aún no ha sido bien esclarecido.

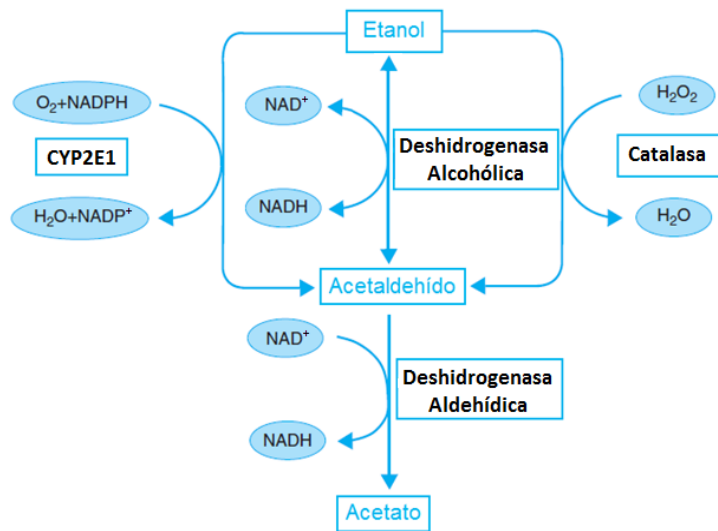
### 1.1.2. Metabolismo del etanol: periferia vs sistema nervioso central

El etanol, luego de ser ingerido, es absorbido por difusión simple a través de la mucosa gastrointestinal, aproximadamente un 20% en el estómago y un 80% en el intestino delgado. Luego, el etanol es distribuido por la sangre a todos los tejidos del organismo según el contenido de agua (Dancygier H., 2010).

#### a) Metabolismo del etanol en la periferia:

En el hígado ocurre aproximadamente el 90% de la metabolización del etanol (Wallgren y Barry, 1970), que comienza con su oxidación a acetaldehído por la acción conjunta de tres enzimas: la deshidrogenasa alcohólica (ADH), el citocromo P4502E1 (CYP2E1) y la catalasa (ver figura 1). De éstas, la ADH es la que ofrece mayor contribución al proceso, debido a que presenta la mayor actividad hepática (Matsumoto y Fukui, 2002). Por su parte, el CYP2E1 da cuenta de la mayor parte de la oxidación no mediada por la ADH, y a diferencia de esta última enzima, el CYP2E1 es inducible por etanol, por lo que el consumo crónico de esta sustancia puede provocar un aumento significativo del metabolismo del etanol por esta vía enzimática (Song et al., 1996). A diferencia de estas dos enzimas, la catalasa no tiene mayor contribución en el metabolismo del etanol a nivel periférico (Cassarett & Doull's, 2008).

Luego de esta primera etapa, la metabolización del etanol sigue con la rápida acción de la ALDH2 mitocondrial, que oxida el acetaldehído a acetato con una  $K_m$  para acetaldehído menor que 200 nM (Farres et al., 1989; Klyosov et al., 1996). Como muestra la figura 1.1, tanto la ADH como la ALDH2 mitocondrial, que constituyen la vía principal de metabolización del etanol a nivel periférico, son dependientes de  $NAD^+$ . Así, esta vía está regulada principalmente por la capacidad mitocondrial de utilizar NADH y regenerar  $NAD^+$ .

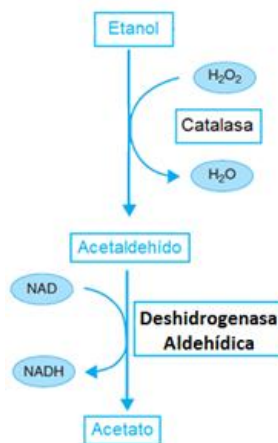


**Fig. 1.1 Rutas de metabolización del etanol a nivel hepático.** El etanol es principalmente oxidado por la acción de la deshidrogenasa alcohólica (ADH), generándose acetaldehído y NADH. Contribuyen a la metabolización del etanol, en menor medida, el citocromo P450E1 (CYP2E1) y la catalasa. La deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2 mitocondrial) posteriormente media la oxidación del acetaldehído en acetato, generando NADH en el proceso (figura adaptada de Cassarett & Doull's, 2008).

b) Metabolismo del etanol a nivel cerebral:

En el cerebro, a diferencia de lo que ocurre en el resto del organismo, la metabolización del etanol a acetaldehído no puede proceder por medio de la ADH, ya que esta enzima no se encuentra presente (Zimatkin y Dietrich, 1997). El estudio de Cohen et al. (1980) dio una evidencia indirecta sobre la existencia de un sistema oxidante de etanol en el cerebro *in vitro*, y que en éste tendría un rol importante la catalasa. Por esto, los estudios que le siguieron se centraron en dilucidar si la catalasa sería la vía enzimática principal de metabolización de etanol. Para esto, se midió la producción de acetaldehído a partir de etanol en homogeneizados de cerebro preincubados con un inhibidor de una de las 3 vías enzimáticas de oxidación de etanol. De esta forma, se vio que el uso de un inhibidor de la catalasa (como el aminotriazol o azida de sodio) disminuyó significativamente la producción de acetaldehído, y además, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cofactor para la reacción de metabolización del etanol catalizada por la catalasa) provocó un aumento en la producción de acetaldehído (Gill et al., 1992). Por otra parte, la adición de un inhibidor de la ADH (pirazol o 4-metil-pirazol) no tuvo efecto en la generación de acetaldehído (Aragon et. al, 1992; Gill et al., 1992), y la incubación con un inhibidor del citocromo P450

(metirapona o dialilsulfato) provocó sólo una disminución de la oxidación del etanol de un 10 – 20% en los extractos cerebrales (Aragon et al., 1992; Gill et al., 1992, Zimatkin et al., 2006). En conjunto, los resultados muestran que la catalasa sería la responsable de más del 60 – 70% de este proceso de metabolización primaria del etanol, y que por lo tanto, la formación *in vivo* de acetaldehído a nivel cerebral dependería principalmente del sistema catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Quertermont et al., 2005, Correa et al., 2012). Al igual que a nivel periférico, la ALDH2 mitocondrial es la encargada de la transformación de acetaldehído en acetato (figura 1.2).



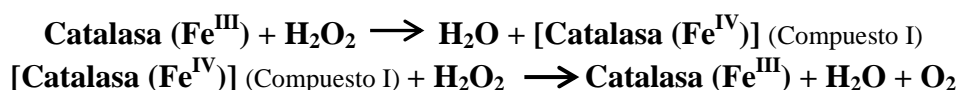
**Fig. 1.2. Metabolismo del etanol a nivel cerebral.** La principal vía de metabolización de etanol a nivel cerebral está constituida por sistema catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que daría cuenta de un 60-70% del proceso (también participan el citocromo P4502E1 (10-20% aproximadamente) y otras vías no descritas que darían cuenta del resto del proceso). El acetaldehído luego es metabolizado a acetato por la deshidrogenasa aldehídica mitocondrial (ALDH2 mitocondrial) (figura adaptada de Cassarett & Doull's, 2008).

Los niveles de acetaldehído generados a nivel cerebral serían independientes de los alcanzados en la sangre, debido a que se ha detectado la presencia de la ALDH2 mitocondrial en la microvasculatura cerebral (Zimatkin et al., 1991), y por lo tanto, el acetaldehído sería metabolizado antes de que pudiera atravesar la barrera hematoencefálica. Esto indica que existe un sistema compartimentalizado de producción de acetaldehído, y por lo tanto, los niveles de acetaldehído generados a nivel cerebral estarían determinados por (i) su velocidad de formación a partir de la oxidación cerebral del etanol principalmente vía catalasa y (ii) su velocidad de degradación por la enzima ALDH2 mitocondrial.



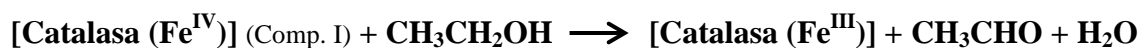
### 1.1.3. Catalasa como vía principal de metabolización del etanol a nivel cerebral

La catalasa es una enzima localizada en los peroxisomas, organelo presente en todas las células eucarióticas. Estructuralmente, esta enzima es un homotetrámero de 240 kDa con un grupo hemo en cada subunidad. Esto le permite catalizar la detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que el hierro del grupo hemo es oxidado por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formándose una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y un intermediario llamado compuesto I, caracterizado por tener un grupo ferroxilo con  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ . En un segundo paso, el compuesto I es reducido por otra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y así el hierro del grupo hemo de la catalasa vuelve a su estado de oxidación inicial además de formarse otra molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (Keilin et al., 1958), como muestra la reacción:



Debido a que el cerebro tiene aproximadamente un 20% del consumo basal de oxígeno, se requiere un sistema anti-oxidante altamente eficaz. A nivel cerebral, la catalasa tiene una expresión muy baja, a diferencia de los eritrocitos u otros tejidos como el hígado en que su expresión es mayor (Halliwell et al., 2006, Goyal y Bassak, 2010), por lo que en el cerebro la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es catalizada principalmente por otro sistema anti-oxidante formado por peroxirredoxinas y glutatión peroxidasa (Halliwell et al., 2006).

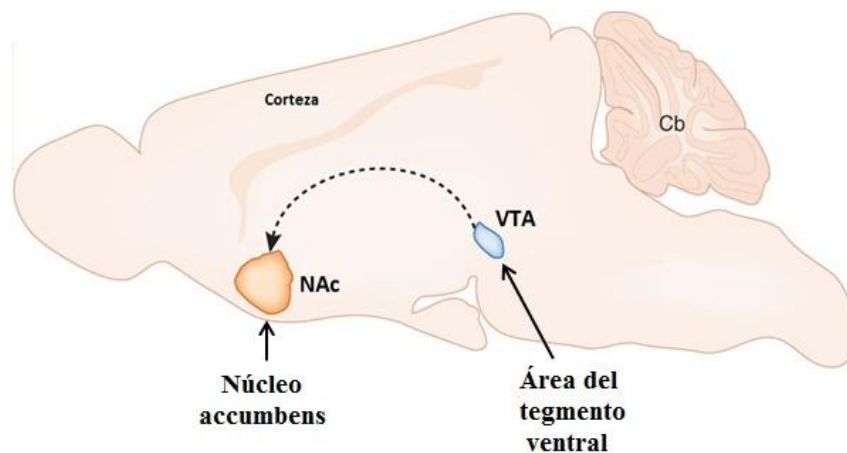
Además de su actividad clásica de detoxificación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (actividad catalítica), la catalasa también posee una actividad peroxidativa que le permite oxidar el etanol utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante. Así, la catalasa al estar en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  forma el compuesto I, que oxidará el etanol según se muestra en la siguiente reacción (Keilin et al., 1958, Cohen et al., 1980):



Así, la metabolización primaria del etanol a nivel central se debería a la actividad peroxidativa con la que actúa la catalasa.

## 1.2. Etanol como pro-droga: rol que tendría el acetaldehído y la importancia de la catalasa en el efecto reforzante del etanol

Aún no ha sido esclarecido cuál es la entidad molecular responsable de generar los efectos farmacológicos del alcohol a nivel central (Quertemont et al., 2005; Correa et al., 2012). Para dilucidar esta problemática, los estudios se han centrado en el efecto que tiene esta droga de abuso en las vías endógenas del refuerzo. El sistema dopaminérgico mesolímbico, que conecta neuronas dopaminérgicas cuyos somas se localizan en el área del tegmento ventral (VTA) y se proyectan hacia el núcleo accumbens (ver figura 1.3), se ha investigado como un sustrato neuronal crítico para explicar el fenómeno de refuerzo, ya que este sistema juega un rol clave en el desarrollo de la adicción a drogas (Di Chiara, 2002; Self y Nestler, 1995).



**Fig. 1.3. Sistema dopaminérgico mesolímbico.** El sistema dopaminérgico mesolímbico está constituido por neuronas dopaminérgicas cuyos somas están localizados en el área del tegmento ventral (VTA) y se proyectan hacia el núcleo accumbens.

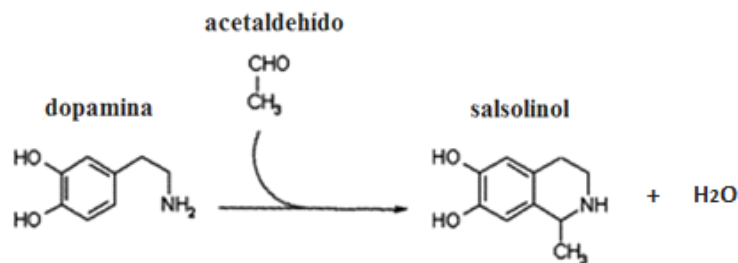
Se ha observado que la mayoría de las drogas de abuso, entre ellas el etanol, aumentan la concentración extracelular de dopamina en el núcleo accumbens, lo que se relacionaría con el refuerzo que éstas generan (Imperato y Di Chiara, 1986; Di Chiara e Imperato, 1988; Carboni et al., 1989; Self y Nestler, 1995; Bustamante et al., 2008). Este efecto del etanol es dosis dependiente y bifásico, esto último porque provoca un aumento en la liberación de dopamina en dosis bajas (0,25 - 0,5 g/kg i.p.) y moderadas (1- 2 g/kg i.p.), pero no en dosis altas (5 g/kg i.p.) (Imperato y Di Chiara, 1986). El acetaldehído, por su parte, al ser administrado sistémicamente (en dosis que atraviesan la barrera hematoencefálica) puede provocar de igual forma liberación de dopamina hacia el núcleo accumbens de manera dosis dependiente, pero a dosis más bajas

que las del propio etanol (Foddai et al., 2004), lo que evidencia que el acetaldehído por sí mismo puede emular este efecto del etanol y sugiere que el acetaldehído sería una molécula mediadora del refuerzo generado por el etanol. Esto último es apoyado por un gran número de investigaciones realizadas en modelos animales de autoadministración y de preferencia condicionada de lugar. En el modelo de autoadministración, se ha observado que ratas se autoadministran acetaldehído en el sistema ventricular del cerebro (Amit et al., 1977; Brown et al., 1979) y esta conducta se establece a concentraciones más bajas que las de etanol (Brown et al., 1979, 1980), lo que indicaría que comparativamente el acetaldehído tendría propiedades reforzantes más potentes. Este hallazgo es apoyado, porque para establecer la autoadministración de acetaldehído directamente en el VTA, se requieren concentraciones entre 6 y 90  $\mu\text{M}$  (Rodd-Henricks et al., 2002), las cuales son 1000 veces menores que las necesarias para establecer la autoadministración con etanol (Rodd-Henricks et al., 2000, Rodd et al., 2005). Además, con el modelo de preferencia condicionada de lugar, se ha observado que las ratas evidencian una preferencia por el lugar donde se les administró una dosis de acetaldehído que atraviesa la barrera hematoencefálica (Smith et al., 1984; Quintanilla y Tampier, 2003). Todas estas evidencias muestran que el acetaldehído tendría capacidad reforzante y que esta sería 1000 veces más potente que la del propio etanol.

Para apoyar la importancia del acetaldehído en el efecto reforzante del etanol, se han realizado diversos estudios de inhibición farmacológica de la catalasa en ratas, esperando una disminución en el consumo de etanol. En un comienzo, se observó que la administración de un inhibidor farmacológico de la catalasa a ratas, provocó tanto una reducción (Aragon y Amit, 1992; Koechling y Amit, 1994; Rotzinger et al., 1994) como un aumento (He et al., 1997) del consumo de alcohol. Además, en experimentos en que también se midió consumo voluntario de alcohol, las ratas tratadas con el inhibidor farmacológico de la catalasa disminuyeron el consumo de sacarina y comida conjuntamente con la disminución en el consumo de alcohol (Tampier et al., 1995). Este último efecto podría ser secundario a cambios en la reacción al sabor o en el control del apetito. Un estudio de Karahanian et al., (2011) que utilizó ratas bebedoras de alcohol (UChB), mostró que la microinyección en el VTA de un vector lentiviral que codifica un shRNA anti-catalasa, provocó una disminución total del consumo voluntario de alcohol. Este efecto se fundamentaría en la disminución de la síntesis de la catalasa, lo que a su vez provoca una disminución de un 75% en la producción de acetaldehído en esta zona del cerebro *in vitro*

(Quintanilla et al., 2012). A diferencia de los tratamientos utilizados en los estudios anteriores, este es específico contra la catalasa, por lo que permitió dar una evidencia clave de la importancia que tiene la presencia de catalasa en el VTA para la generación del refuerzo. Sin embargo, no se midió que efectivamente hubiera una disminución en la producción de acetaldehído en el VTA *in vivo*, por lo que aún no está definido si realmente es esta disminución la que provoca la disminución en el consumo voluntario de alcohol.

Por otra parte, se ha postulado que el efecto que tendría el acetaldehído sobre las vías endógenas del refuerzo estaría mediado por un producto de condensación entre el acetaldehído y la dopamina que se encuentra presente en el sistema dopaminérgico mesolímbico. Este producto de condensación es el salsolinol (ver figura 1.4), molécula que se estima tendría una potencia reforzante entre 10 y 100 veces mayor que la del propio acetaldehído (Rodd et al., 2008). Sin embargo, aún sigue siendo controversial el rol del salsolinol en el efecto reforzante del etanol, debido a que aún no existe evidencia clara sobre un aumento en los niveles de salsolinol en el sistema dopaminérgico mesolímbico tras una dosis reforzante de alcohol (Hipólito et al., 2012).



**Fig. 1.4. Formación de salsolinol.** La dopamina condensa con el acetaldehído en una reacción de Pictet-Spengler, formándose salsolinol.

Aunque la mayor parte de las evidencias apoyan el importante papel que tendría el acetaldehído en el efecto reforzante del etanol, no existen estudios que hayan medido la generación de acetaldehído *in vivo* en el cerebro de rata, ni tampoco en el sistema dopaminérgico mesolímbico, luego de una dosis aguda de etanol. De esto se infiere además, que tampoco se ha logrado determinar si posterior a una dosis reforzante de etanol, el acetaldehído que se generaría en el VTA se encuentra dentro del rango de concentraciones reforzantes reportadas (6 – 90  $\mu\text{M}$ ; Rodd-Henricks et al., 2002). Esta es una de las razones por las que aún no se ha podido establecer claramente cuáles son los mecanismos que provocan el refuerzo y la dependencia del alcohol.

### **1.3. El problema de medir acetaldehído *in vivo* a nivel cerebral**

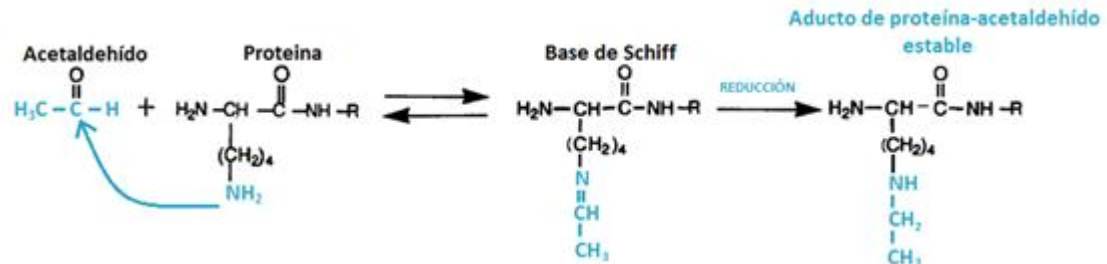
Hasta ahora, sólo se han medido los niveles de acetaldehído generados *in vitro* en homogeneizados de cerebro incubados con etanol (Aragon et al., 1992; Gill et al., 1992, Zimatkin et al., 2006). Sin embargo no se conoce si este resultado se correlaciona efectivamente con la generación de acetaldehído a nivel cerebral luego de una dosis de etanol. Determinar cuáles son los niveles de acetaldehído a nivel cerebral, o específicamente en el VTA, luego de una dosis reforzante de etanol, es una pregunta crítica en la postulación de esta molécula como agente neuroactivo, por lo que se hace necesario una clara determinación de los niveles de acetaldehído en el cerebro y que de esta forma puedan ser relacionados con el comportamiento provocado por una dosis de etanol.

Los resultados negativos que se han obtenido al intentar determinar el nivel de acetaldehído cerebral generado luego de una dosis aguda de etanol, se deberían principalmente a que la ALDH2 mitocondrial metaboliza muy rápido al acetaldehído, y esto dificultaría la detección de esta molécula. Esto es apoyado porque se ha podido detectar el acetaldehído que se encuentra *in vivo* en el cerebro de ratas luego de una dosis de etanol, sólo si previamente los animales son tratados con cianamida, un inhibidor farmacológico de la ALDH2 mitocondrial (Jamal et al., 2003).

### **1.4. Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de acetaldehído**

La metabolización de las drogas de abuso y fármacos usualmente genera moléculas sin actividad biológica que son eliminadas del organismo. Sin embargo, en el caso del etanol, su metabolito primario, el acetaldehído, es una molécula altamente reactiva, capaz de reaccionar con otras moléculas por condensación, polimerización o aducción (Quertemont et al., 2005). Esta última reacción se hace importante a nivel biológico, debido a que se ha demostrado que el acetaldehído es capaz de reaccionar con las proteínas formando aductos de proteína-acetaldehído (aductos) que pueden ser estables o inestables (Tuma et al., 1984; Donohue et al., 1983 (a, b); Xu et al., 1989). Estos aductos se producen por el ataque nucleofílico principalmente del grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina al grupo carbonilo del acetaldehído, formando una base de Schiff inestable, que puede ser estabilizada por reducción con agentes como el cianoborohidruro de sodio

(NaCNBH<sub>3</sub>) o borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) (Donohue et al., 1983 (a); Tuma et al., 1984) (ver figura 1.5).



**Fig. 1.5. Formación de aductos de proteína-acetaldehído.** El ataque nucleofílico principalmente del grupo ε-amino de las lisinas presentes en las proteínas hacia el grupo carbonilo del acetaldehído induce la formación de una base de Schiff, que al ser reducida (por ejemplo, con NaCNBH<sub>3</sub>) forma un aducto de proteína-acetaldehído estable.

Existen numerosos estudios que se han centrado en intentar encontrar aductos estables en diferentes tejidos luego del consumo crónico de etanol, utilizando técnicas inmunológicas para la detección (inmunohistoquímica, Western blot o ELISA). En la mayoría de estas investigaciones, se ha tenido como tejido blanco el hígado (Lin et al., 1988, 1993; Lumeng et al., 1991; Jeong et al., 2000) por su alta tasa de metabolización de etanol, y se ha encontrado que en este órgano hay formación de aductos estables *in vivo* luego de que ratas fueran expuestas al consumo de etanol durante por lo menos 2 semanas (Lin et al., 1988, 1993). En cambio, existen muy pocos estudios relacionados con la detección de aductos estables en el cerebro. Rintala et al., (2000) dio la primera evidencia de que sí existe formación de aductos estables luego de 21 meses de consumo crónico de etanol, específicamente en el cerebelo y en la corteza cerebral de ratas. En esta última zona, la mayor parte de los aductos se encontraron en la fracción mitocondrial, lo que podría dar cuenta de la neurodegeneración (Upadhyya et al., 2002). Además, un estudio post-mortem de un paciente alcohólico que bebió por 24 años, evidenció formación de aductos estables en la corteza frontal y en el mesencéfalo (Nakamura et al., 2003). Hasta el momento, no se han hecho estudios de detección de aductos en otras zonas del cerebro, y en ninguno se ha podido detectar la presencia de estos aductos antes de un período de 1 año de tratamiento crónico de etanol, sugiriendo que se requieren largos períodos de consumo crónico de alcohol para que exista una cantidad suficiente de aductos estables que puedan ser detectados por técnicas inmunológicas. Para lograr la formación aguda de aductos estables, sólo se han realizado estudios *in vitro* que han utilizado principalmente agentes reductores que no están presentes en condiciones

fisiológicas, como NaCNBH<sub>3</sub> o NaBH<sub>4</sub> (Tuma et al., 1984; Donohue et al., 1983 (a); Israel et al., 1986).

### **1.5. Propuesta de investigación**

En base a los antecedentes presentados, se propone: (i) establecer una metodología que permita detectar el acetaldehído que se encuentra en el cerebro total, y específicamente en el sistema dopaminérgico mesolímbico de rata, luego de una dosis reforzante de etanol, (ii) estimar la concentración de acetaldehído que se encuentra en el cerebro total, y específicamente en el VTA, luego de una dosis reforzante de etanol. Se propone medir indirectamente el acetaldehído, detectando aductos de proteína-acetaldehído que serán formados y estabilizados *in vivo* en el cerebro de las ratas después de una dosis de etanol y del agente reductor NaCNBH<sub>3</sub>. Los aductos de proteína-acetaldehído serán detectados por Western blot, utilizando un suero obtenido de ratones inmunizados con aductos de BSA-acetaldehído. De esta forma, esta propuesta busca, por una parte, establecer que luego de una dosis de etanol efectivamente se genera acetaldehído en el cerebro de ratas, y por otra parte, busca esclarecer el rol del acetaldehído en el efecto reforzante del etanol a través de la estimación de los niveles de acetaldehído que se generan en el VTA de ratas luego de una dosis reforzante de etanol. Para detectar la generación de acetaldehído en el cerebro, VTA, y núcleo accumbens de rata, el etanol será administrado en dosis de 1 ó 2 g/kg i.p. debido a que ambas dosis estimulan el sistema de recompensa provocando la liberación de dopamina hacia el núcleo accumbens de las ratas (Imperato y Di Chiara, 1986). Sin embargo, para determinar los niveles de acetaldehído que se generan a nivel cerebral y en el VTA, la dosis de etanol que se les administrará a las ratas será de 1 g/kg i.p., ya que se ha visto que el equivalente a dicha dosis el etanol es altamente autoadministrado por las ratas en el VTA, a diferencia de la dosis equivalente a 2 g/kg i.p. (Rodd et al., 2005). De esta forma se podría relacionar la administración de una dosis de etanol, con los niveles de acetaldehído generados y el comportamiento reforzante generado en los animales.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS**

La administración de una dosis reforzante de etanol produce aductos de proteína-acetaldehído en el cerebro de rata, los cuales al ser estabilizados en una reacción con el agente reductor cianoborohidruro ( $\text{NaCNBH}_3$ ), son indicativos de la concentración de acetaldehído generada en este órgano.

### **2.2. OBJETIVO GENERAL**

Detectar aductos de proteína-acetaldehído en el cerebro de rata, y específicamente en el área del tegmento ventral y núcleo accumbens, luego de la administración de una dosis reforzante de etanol y una dosis de  $\text{NaCNBH}_3$ .

### **2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.3.1.** Elaborar una metodología apropiada para la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en cerebro de rata, luego de la administración una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.).

**2.3.2.** Detectar, por Western blot, la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables en el área del tegmento ventral y núcleo accumbens de rata luego de la administración de una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.).

**2.3.3.** Estimar los niveles de acetaldehído que se encuentran en el cerebro de rata, y específicamente en el área del tegmento ventral, luego de la administración de una dosis altamente reforzante de etanol (1 g/kg i.p.), mediante la detección por Western blot de aductos de proteína-acetaldehído.



### **3. MATERIALES**

#### **3.1. Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa bebedora de alcohol UChB, de 250 – 300 g. Esta cepa, derivada de ratas Wistar, se ha mantenido en la Universidad de Chile por más de 80 generaciones. Los animales fueron mantenidos en jaulas con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y con acceso libre a comida y agua. Todos los estudios se realizaron con animales que nunca fueron expuestos al consumo de alcohol.

#### **3.2. Reactivos**

##### **3.2.1. Anticuerpos**

Se utilizó un suero inmune anti-aductos de proteína-acetaldehído, obtenido por la inmunización de ratones con aductos de BSA-acetaldehído, los cuales fueron generados según la metodología de Israel et al., (1986). El procedimiento de inmunización se realizó por Biosonda S.A. El título de los anticuerpos se realizó por ELISA indirecto, según el procedimiento realizado por Israel et al. (1986). Además, se utilizó un anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) contra IgG de ratón, hecho en cabra (goat anti-mouse IgG-HRP, #sc-2005, Santa Cruz, CA., EE.UU.).

##### **3.2.2. Reactivos generales**

*Bio-Rad (Hércules, CA, EE.UU):* Bio-Rad protein assay. *Calbiochem (Darmstadt, Germany):* cóctel de inhibidores de proteasas (AESBF 2 mM, aprotinina 1,6 μM, bestatina 0,1 mM, E-64 0,03 mM, leupeptina 0,04 mM, pepstatina A 0,02 mM. #539134). *Fermentas (Burlington, Canadá):* estándar de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, #SM0671). *ICN Pharmaceuticals (Ohio, EE.UU):* aminotriazol. *Merck (Darmstadt, Alemania):* cloruro de sodio (NaCl), dipotasio hidrógeno fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), etanol, glucosa, metanol, potasio dihidrógeno fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), trizma-base. *Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.):* acetaldehído, cianamida, glicina, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH<sub>3</sub>), pirazol, rojo Ponceau S, dodecil sulfato de sodio

(SDS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), tritón x-100, tween 20. *Winkler (Santiago, Chile)*: acrilamida/biscarilamida 40%.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Determinación de condiciones de uso de NaCNBH<sub>3</sub> como agente estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído (*in vitro*)

#### 4.1.1. Determinación de la concentración de NaCNBH<sub>3</sub> que permite la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables (estabilización *ex vivo*)

Se administró a ratas una dosis de etanol de 1 g/kg i.p. de peso de una solución de etanol (20% v/v en solución salina). Luego de 1 hora, se extrajo el cerebro y se seccionó en trozos de aproximadamente 250 mg de tejido. Cada sección obtenida fue trasladada rápidamente a 2,5 mL de una solución de tampón fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4 tritón x-100 0,1%, con una concentración de NaCNBH<sub>3</sub> de 0 mM; 0,05 mM; 0,5 mM; 1 mM; 10 mM ó 100 mM. Todas las muestras se homogeneizaron en Ultra Turrax T25, en presencia del cóctel de inhibidores de proteasas. Luego, se incubaron durante 30 minutos en hielo, y se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos de las diferentes muestras, se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot (ver condiciones en sección 4.7.).

Para descartar que el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM en ausencia de acetaldehído provoque la formación de aductos estables, y además para determinar si el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM permite la formación de aductos en el rango de concentraciones de acetaldehído que se espera encontrar a nivel cerebral luego de una dosis de etanol, se eutanizaron ratas controles no expuestas al consumo de alcohol mediante decapitación para obtener su cerebro. Éste fue rápidamente trasladado de una solución de tampón fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4 tritón x-100 0,1% que contenía el cóctel de inhibidores de proteasas, y se homogeneizó en Ultra Turrax T25. Ocho alícuotas de 400 µL de homogeneizado de cerebro al 10% se trasladaron a frascos para cromatografía de gases (de modo de evitar la evaporación de acetaldehído), y a cada una se le agregó una determinada

concentración de acetaldehído, en presencia o en ausencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM según muestra la tabla:

<b>Condiciones</b>								
	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>Acetaldehído (μM)</b>	0	0	20	40	40	100	200	200
<b>NaCNBH<sub>3</sub> (mM)</b>	0	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0

La muestra A se utilizó como control negativo. Todas las muestras de las condiciones A-H se llevaron a un volumen final de 2 mL. Luego, se incubaron durante 30 minutos en hielo, y se centrifugaron a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### **4.1.2. Evaluación del efecto del NaCNBH<sub>3</sub> en la formación cerebral de acetaldehído a partir de etanol (*in vitro*)**

Se eutanizaron ratas controles no expuestas al consumo de alcohol mediante decapitación, y se extrajeron sus cerebros. Éste fue rápidamente trasladado a una solución de tampón fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4 tritón x-100 0,1% que contenía el cóctel de inhibidores de proteasas, y se homogeneizó en Ultra Turrax T25. Para evaluar si el NaCNBH<sub>3</sub> inhibe el metabolismo cerebral del etanol, una alícuota de 1 mL de homogeneizado de cerebro se preincubó durante 30 minutos a 37°C con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM. Luego, se agregó etanol 100 mM, y se incubó durante 6 horas a 37°C en presencia de glucosa 10 mM. Una segunda alícuota de homogeneizado de cerebro se incubó durante 15 minutos a 37°C con etanol 100 mM en presencia de glucosa 10 mM, y luego se le agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, y se incubó durante 6 horas a 37°C. Como controles negativos se utilizaron 2 alícuotas de 1 mL de homogeneizados de cerebro, una sólo con etanol 100 mM y otra sólo con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, y también se incubaron durante 6 horas a 37°C. Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 2 mL. Luego, de detener la reacción con aminotriazol 10 mM, se centrifugaron las muestras a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A los sobrenadantes

obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### 4.1.3. Estimación del tiempo en que el NaCNBH<sub>3</sub> permite la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído (*in vitro*)

Los cerebros se procesaron según se describe en 4.1.2. Cuatro alícuotas de 1 mL de homogeneizado de cerebro al 10% se trasladaron a frascos para cromatografía de gases (de modo de evitar la evaporación de acetaldehído), a cada una se le agregó etanol 100 mM, y se incubaron a 37°C en presencia de glucosa 10 mM. Para evaluar el tiempo en que el NaCNBH<sub>3</sub> en concentración 0,5 mM permite la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído, se agregó esta sustancia en una dosis, o en dosis repetidas a diferentes tiempos del comienzo del metabolismo del etanol, según muestra la siguiente tabla (las muestras A y B se utilizaron como controles negativos):

<b>Condiciones</b>						
	A	B	C	D	E	F
<b>Etanol (100 mM)</b>	-	+	+	+	+	+
<b>NaCNBH<sub>3</sub> (0,5 mM)</b>	+	-	+	+	+	+
<b>N° dosis de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM</b>	1	-	1	2	3	4
<b>Tiempo de administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM</b>	15 min	-	15 min	15 min 1 hora	15 min 1 hora 3 horas	15 min 1 hora 3 horas 6 horas

Todas las muestras fueron incubadas durante 6 horas a 37 °C, en volumen final de 2 mL. Luego, de detener la reacción con aminotriazol 10 mM (inhibidor de la catalasa), se centrifugaron las muestras a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### 4.1.4. Evaluación de la posible saturación de las proteínas cerebrales para formar aductos estables con el acetaldehído (*in vitro*)

Los cerebros se procesaron según se describe en 4.1.2. Cuatro alícuotas de 1 mL de homogeneizado de cerebro al 10% se trasladaron a frascos para cromatografía de gases (de modo de evitar la evaporación de acetaldehído), se les agregó etanol 100 mM, y se incubaron a 37°C en presencia de glucosa 10 mM. Luego de 15 minutos, a las muestras se les agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM. Para evaluar el tiempo en que las proteínas cerebrales pueden captar acetaldehído formando aductos estables, a uno de los homogeneizados además se le agregó acetaldehído a las 6 horas del comienzo del metabolismo del etanol. Las condiciones trabajadas en cada muestra se describen en la siguiente tabla (las muestras A y B se utilizaron como controles negativos):

<b>Condiciones</b>				
	A	B	C	D
<b>Etanol (100 mM)</b>	-	+	+	+
<b>NaCNBH<sub>3</sub> (0,5 mM)</b>	+	-	+	+
<b>Acetaldehído (200 µM)</b>	-	+	-	+
<b>Tiempo de administración de acetaldehído</b>	-	6 horas	-	6 horas

Todas las muestras fueron incubadas durante 6 horas a 37 °C, en volumen final de 2 mL. Luego, de detener la reacción con aminotriazol 10 mM (inhibidor de la catalasa), se centrifugaron las muestras a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### **4.2. Evaluación de la administración estereotáxica de NaCNBH<sub>3</sub> en el área del tegmento ventral (VTA) o intracerebroventricular (ICV) para estudios de estabilización de aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en el cerebro total de ratas, luego de una dosis de etanol 2 g/kg i.p.**

Se anestesiaron 5 ratas con una mezcla de aire e isoflurano 2% administrado a través de una máscara ajustada sobre la nariz de los animales, y se fijaron en el aparato estereotáxico de Kopf, con el cráneo orientado según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Teniendo el cráneo ya expuesto, se administró una dosis i.p. de 2 g/kg de peso de una solución de etanol 20% v/v en solución salina, y luego de 15 minutos: (i) a una rata se le administró en el ventrículo lateral izquierdo (B -0,8, -1,6, -3,4; figura 4.1.) 5 µL de una solución de NaCNBH<sub>3</sub> 9 mM (volumen de LCR en ratas = 90 µL, concentración final de NaCNBH<sub>3</sub> en LCR = 0,5 mM), utilizando una jeringa Hamilton de 10 µL (figura 4.3, A). (ii) a una segunda rata se le administró en el VTA (B -5,2, -0,8, -7,2; figura 4.2.) 1 µL de una solución de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, utilizando una jeringa Hamilton de 2 µL (figura 4.3, B), Pasados 30 minutos, se disecó el cerebro de las ratas, y se trasladaron rápidamente, a una matriz que permite cortes de 500 µm para obtener el núcleo accumbens. Esta zona cerebral, y el resto del cerebro, se homogeneizaron por separado en tampón fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4 que contenía el cóctel de inhibidores de proteasas, y posteriormente se centrifugaron a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A otras dos ratas se les administró una dosis i.p. de cianamida 20 mg/kg (inhibidor de ALDH2) y luego de 20 minutos se realizó el mismo tratamiento anterior (figura 4.3, C y D). A una quinta rata se le administró una dosis i.p. de 2 g/kg de peso de una solución de etanol (20% v/v en solución salina), y luego de 15 minutos se le administró en el ventrículo lateral izquierdo 5 µL de una solución de NaCNBH<sub>3</sub> 9 mM (concentración final de NaCNBH<sub>3</sub> en LCR = 0,5 mM), pero con la diferencia de que su cerebro se obtuvo luego de 3 horas de haber administrado el NaCNBH<sub>3</sub> (ver figura 4.3, E).

A los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

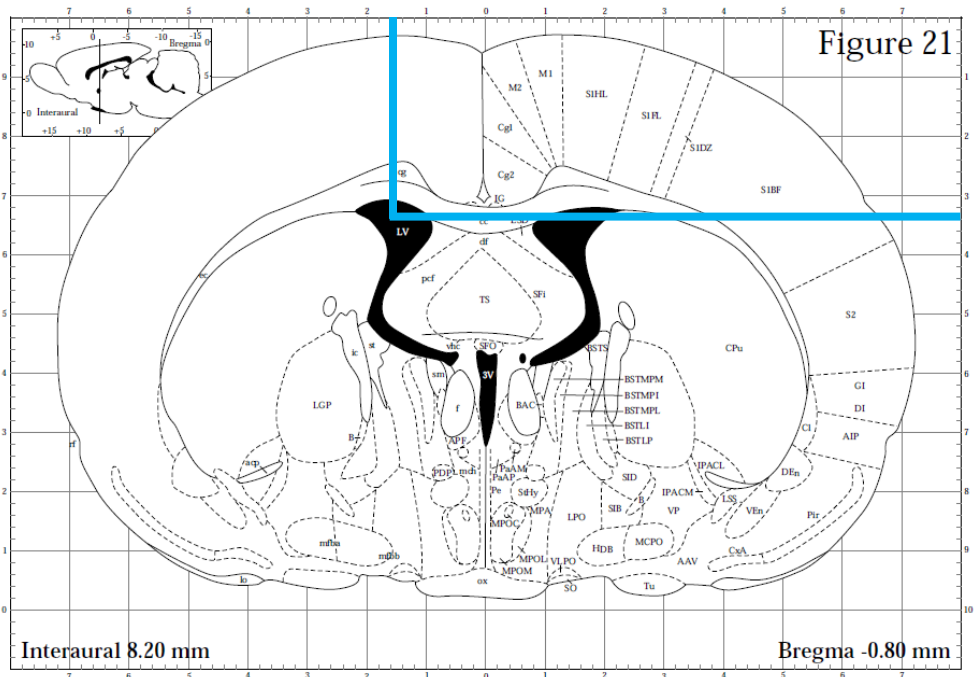


Fig. 4.1. Coordenadas estereotáxicas que determinan la la inyección de una sustancia en el ventrículo lateral izquierdo de rata (B -0,8, -1,6, -3,4) (Paxinos y Watson (1986))

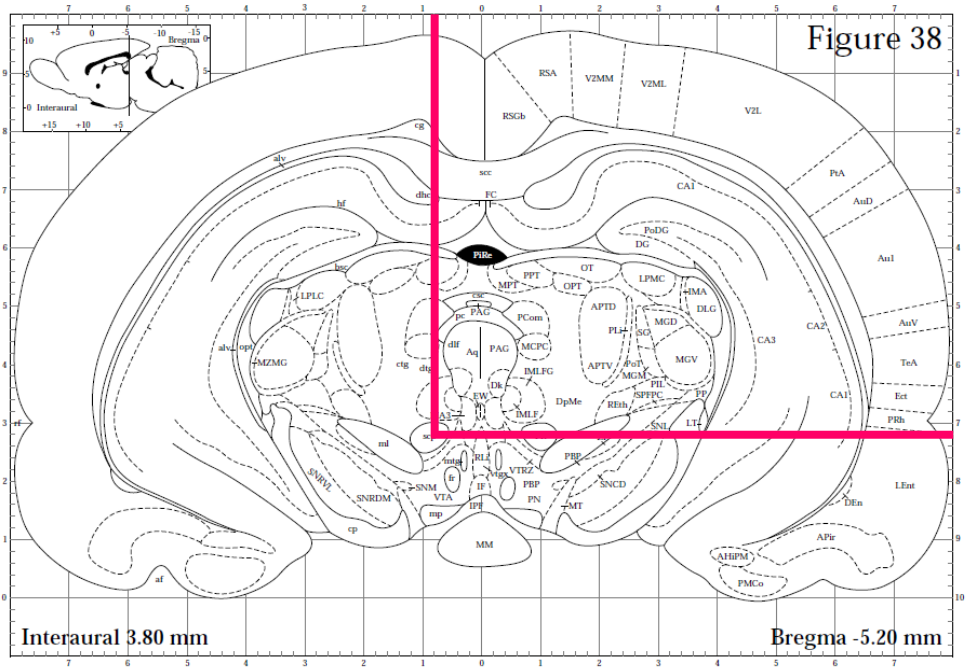


Fig. 4.2. Coordenadas estereotáxicas que determinan la inyección de una sustancia en el VTA de rata (B -5,2, -0,8, -7,2) (Paxinos y Watson (1986))

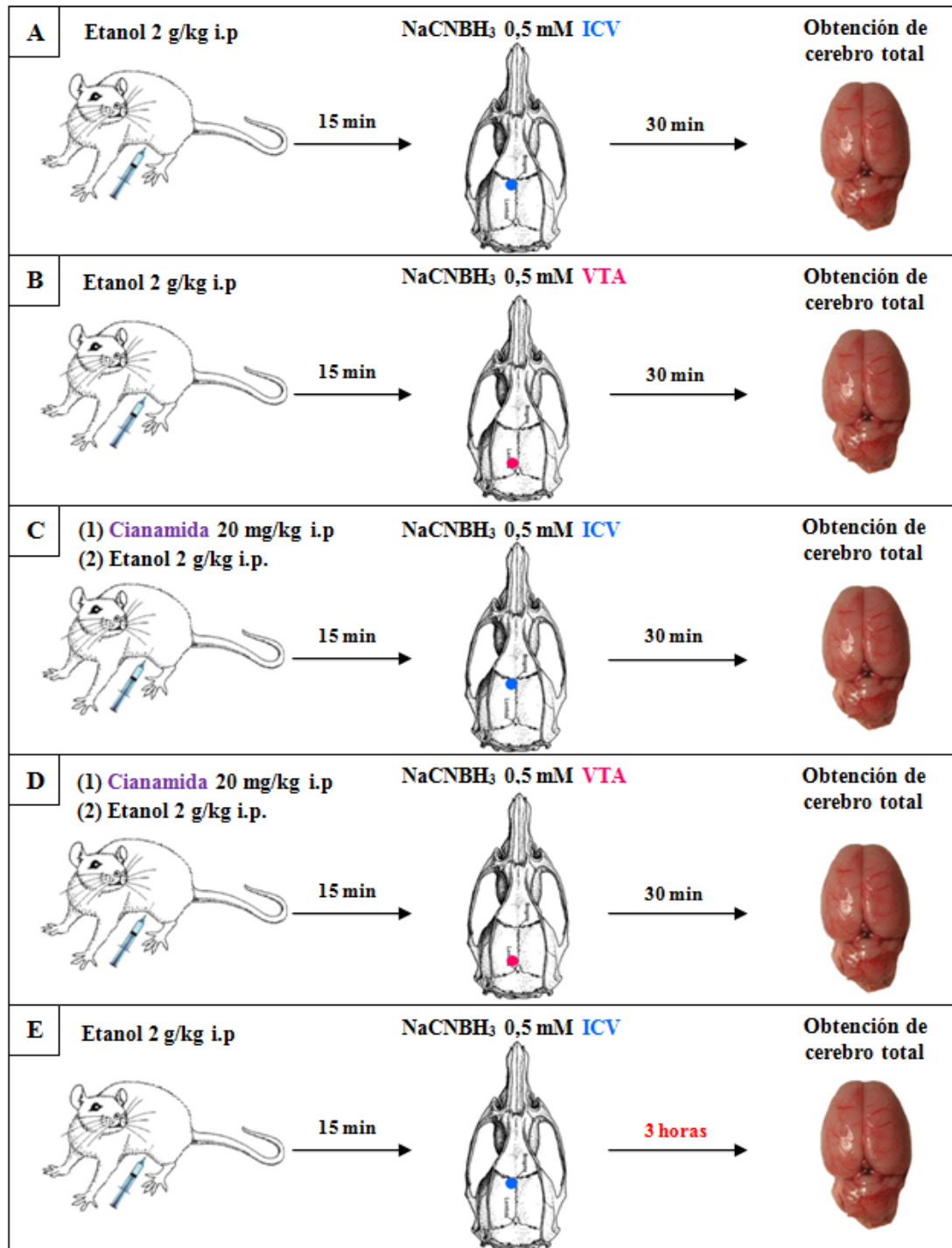


Fig. 4.3. Evaluación de la administración estereotáxica de NaCNBH<sub>3</sub> en el área del tegmento ventral (VTA) o intracerebroventricular (ICV) para estudios de estabilización de aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en el cerebro de ratas, luego de una dosis aguda de etanol.



### **4.3. Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de niveles de acetaldehído presentes en un tejido**

#### **4.3.1. Formación de aductos de proteína-acetaldehído en homogeneizados de cerebro incubados con concentraciones crecientes de acetaldehído, en presencia de NaCNBH<sub>3</sub>**

A los homogeneizados obtenidos según lo descrito en la sección 4.1.1 se les agregó concentraciones crecientes de acetaldehído y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, según muestra la siguiente tabla (las muestras A y B se utilizaron como controles negativos):

<b>Condiciones</b>						
	A	B	C	D	E	F
<b>Acetaldehído (μM)</b>	0	0	20	40	100	200
<b>NaCNBH<sub>3</sub> (mM)</b>	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 2 mL. Luego, se incubaron durante 30 minutos a 37°C, y se centrifugaron a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos se les cuantificó proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### **4.3.2. Validación de la técnica: estimación de niveles de acetaldehído generados por el metabolismo del etanol *in vitro* a nivel cerebral, utilizando como medida indirecta la formación de aductos de proteína-acetaldehído**

Una alícuota de homogeneizado de cerebro al 10% (obtenido según el punto 4.1.2) se trasladó a un frasco para cromatografía de gases (de modo de evitar la evaporación de acetaldehído), se le agregó etanol 100 mM en presencia de glucosa 10 mM y se incubó a 37°C. Luego de 15 minutos, se agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, y se detuvo la reacción con aminotriazol 10 mM. Se centrifugó la muestra a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C, a su sobrenadante se le cuantificó

proteínas por el método de Bradford, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por Western blot. Para cuantificar la concentración de acetaldehído, se utilizó una curva que relaciona la concentración de acetaldehído con la formación de aductos de proteína-acetaldehído, obtenida según lo descrito en la sección 4.3.1.

#### **4.3.3. Relación entre la concentración de acetaldehído mantenida durante 30 minutos en un homogeneizados de cerebro o de VTA y la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído estables durante ese tiempo**

Se eutanizaron mediante decapitación 15 ratas controles no expuestas al consumo de alcohol, y se extrajeron sus cerebros. Cada cerebro fue trasladado rápidamente a una matriz que permite cortes de  $500\ \mu\text{m}$ , y se realizó un primer corte coronal a la altura de los pedúnculos cerebrales y un segundo corte coronal espaciado a  $2\ \text{mm}$  del primero, hacia el bulbo olfatorio, para obtener una sección coronal que contiene el VTA. Para obtener el VTA, se utilizó un punch de 12-gauge. Las 15 VTA obtenidas fueron separadas en 5 grupos (que contenían 3 VTA cada uno) y se homogeneizaron en  $150\ \mu\text{L}$  de una solución de tampón fosfato de potasio  $0,1\ \text{M}$  pH 7,4 en presencia del cóctel de inhibidores de proteasas. Los 5 homogeneizados se inyectaron en cassettes de diálisis, utilizando jeringas de 18-gauge y al término de la inyección se les extrajo el aire. Cada cassette había sido previamente inmerso en  $50\ \text{mL}$  de acetaldehído  $0, 5, 20, 40$  ó  $90\ \mu\text{M}$  durante 30 minutos a temperatura ambiente y en botellas cerradas, con el fin de bloquear posibles sitios de unión de acetaldehído a la membrana de diálisis. Luego, los cassettes que contenían los homogeneizados de VTA, se sumergieron en  $900\ \text{mL}$  de una solución de acetaldehído  $0, 5, 20, 40$  ó  $90\ \mu\text{M}$ , todos en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$   $0,5\ \text{mM}$ , y se incubaron con agitación durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en botellas cerradas. Este mismo tratamiento se realizó en paralelo con homogeneizados de cerebro. Se centrifugaron las muestras a  $1000\ \text{g}$ , durante 15 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , a sus sobrenadantes se les cuantificaron proteínas por el método de Bradford y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por Western blot.

#### **4.4. Estimación de los niveles de acetaldehído alcanzados *in vivo* en cerebro total y VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p.**

Se anestesiaron 5 ratas con una mezcla de aire e isoflurano 2% administrado a través de una máscara ajustada sobre la nariz de los animales, y se pusieron en el aparato estereotáxico de Kopf, con el cráneo orientado según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Teniendo el cráneo ya expuesto, se administró una dosis i.p. de 1 g/kg de peso de una solución de etanol 20% v/v en solución salina, y luego de 15 minutos a los animales se les administró en el ventrículo lateral izquierdo (B -0,8, -1,6, -3,4; figura 4.1) 5  $\mu$ L de una solución de NaCNBH<sub>3</sub> 9 mM (volumen de LCR en ratas = 90  $\mu$ L, concentración final de NaCNBH<sub>3</sub> en LCR = 0,5 mM), utilizando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L (figura 4.3, A). Pasados 30 minutos, se obtuvo el cerebro de las ratas, y se trasladaron rápidamente, a una matriz que permite cortes de 500  $\mu$ m para obtener el VTA según lo descrito en la sección 4.3.3. Esta zona cerebral, y el resto del cerebro, se homogeneizaron por separado en tampón fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4 que contenía el cóctel de inhibidores de proteasas. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron a 1000 g, durante 15 minutos, a 4°C, a sus sobrenadantes se les cuantificaron proteínas por el método de Bradford, y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por Western blot. Para cuantificar la concentración de acetaldehído, se utilizó una curva que relaciona la concentración de acetaldehído con la formación de aductos de proteína-acetaldehído, obtenida según lo descrito en la sección 4.3.3.

#### **4.5. Competencia entre la formación de aductos de proteína-acetaldehído y la formación de salsolinol en homogeneizados de cerebro que se les agrega dopamina, NaCNBH<sub>3</sub> y acetaldehído**

A cuatro alícuotas de 1 mL de homogeneizados de cerebro al 10%, obtenidos según lo descrito en la sección 4.1.2., se les agregó en el siguiente orden: (1) dopamina 10<sup>-2</sup> (concentración en vesículas de neuronas dopaminérgicas), 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> ó 10<sup>-6</sup> M (esta última concentración es la del citoplasma de neuronas dopaminérgicas), (2) NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, (3) acetaldehído 90  $\mu$ M. En todas las condiciones se incubó durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron las muestras a 1000

g, durante 15 minutos, a 4°C, a su sobrenadante se le cuantificó proteínas por el método de Bradford, y se almacenó a -20°C hasta su análisis por Western blot.

#### **4.6. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford**

Las proteínas se cuantificaron a través del sistema Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU), que se basa en el método de Bradford (Bradford, 1976). Cuando el volumen total de muestra lo permitía, se utilizó el macroensayo, mezclando 50 µL de las muestras diluidas en H<sub>2</sub>O nanopura 1:5 ó 1:10 con 2,5 mL del reactivo de tinción (diluido en H<sub>2</sub>O nanopura 1:4). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se determinó su absorbancia a 595 nm. Para conocer la concentración de proteínas totales, esta medida fue interpolada en una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) que para el macroensayo se encuentra entre 0,2 y 0,9 mg/mL.

Ya que el volumen total de muestra a analizar en ocasiones fue muy pequeño, se utilizó un microensayo (*Bradford microassay*, Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU), mezclando 10 µL de las muestras diluidas H<sub>2</sub>O nanopura 1:5 ó 1:10 con 200 µL del reactivo de tinción (diluido en H<sub>2</sub>O nanopura 1:4). En este caso, el rango lineal de la curva estándar de BSA se encuentra entre 0,05 y 0,5 mg/mL.

#### **4.7. Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído estables**

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de las muestras a analizar (70V durante 30 minutos, 100V durante 90 minutos) con un gel resolutivo al 10% y un gel concentrador al 5%, ambos en tampón tris-HCl. Las muestras previamente se mezclaron en una razón 1:1 en tampón Laemmli 2X (SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%, tris-HCl 0,125 M, pH 6,8) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa Trans blot (0.2 µm, Bio-Rad) (100V durante 1 hora) y la correcta transferencia de las proteínas se visualizó tiñendo la membrana con rojo Ponceau S (0,1% Ponceau S, ácido acético 5% por 1 min). El bloqueo se

realizó con leche descremada Svelty 5% en TBS-Tween 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente se incubó con el suero inmune anti-aductos de proteína-acetaldehído (dilución 1:5.000 en leche 5% TBS-Tween 0,1%), durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego, se incubó con un anticuerpo secundario asociado a peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:10.000, #sc-2005. Santa Cruz, CA, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. El revelado se realizó con un reactivo quimioluminiscente que detecta a la HRP (kit de revelado Western Lightning® Plus-ECL, Perkin-Elmer, Massachusetts, EE.UU.). La quimioluminiscencia emitida desde la membrana se detectó con una película BioMax XAR (Kodak, Rochester, NY, EE.UU.). La película se reveló en una solución reveladora Kodak 6mx, se lavó con agua, y se fijó en una solución fijadora (Agfa G-334, Morstel, Bélgica). La cuantificación densitométrica de las bandas de todas las proteínas que formaron aductos se realizó mediante el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), que detecta cada pixel de la banda y lo convierte en un valor numérico considerando su intensidad (número de pixeles). La normalización de datos y de carga se realizó detectando y cuantificando  $\beta$ -actina en cada muestra.

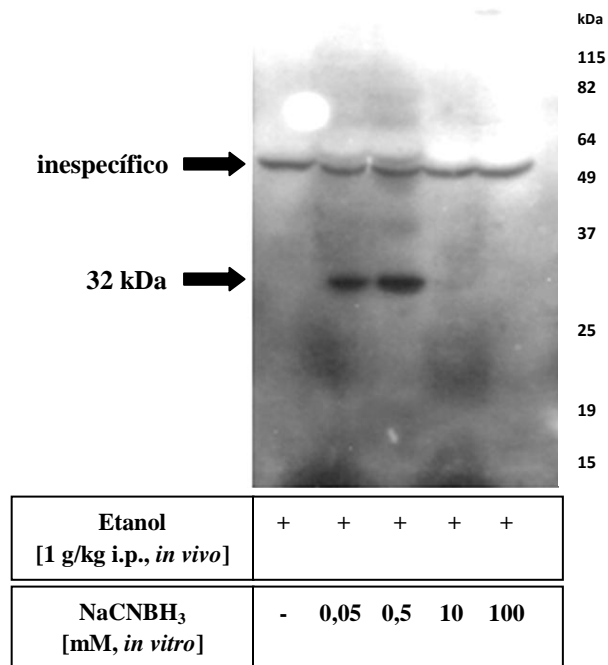
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinación de condiciones de uso de NaCNBH<sub>3</sub> como estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído (*in vitro*)

#### 5.1.1. Determinación de la concentración de NaCNBH<sub>3</sub> que permite la formación de aductos estables (estabilización *ex vivo*)

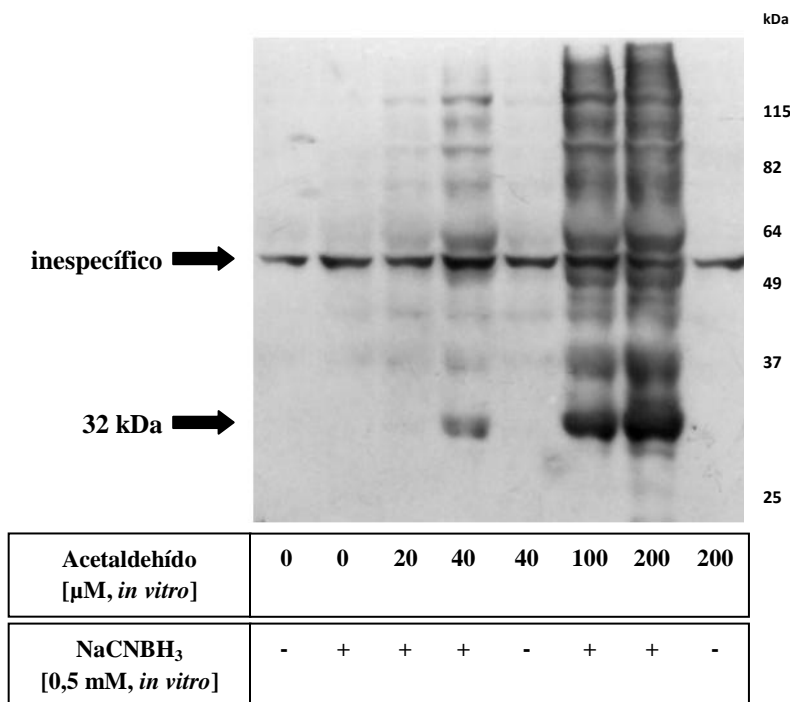
Debido a que no se ha reportado en la literatura la utilización de NaCNBH<sub>3</sub> *in vivo* como agente estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído, se determinó qué dosis de NaCNBH<sub>3</sub> se debe administrar a una rata para lograr la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables en su cerebro luego de una dosis aguda de etanol. Puesto a que, por una parte, no se conoce la DL<sub>50</sub> del NaCNBH<sub>3</sub> en ratas, y esta molécula se reconoce como altamente tóxica por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel (reglamento (CE) N° 1272/2008 [UE-GSH/CLP]), y que por otra parte, no se conoce si el NaCNBH<sub>3</sub> puede atravesar la barrera hematoencefálica, fue necesario ensayar *in vitro* las diferentes concentraciones de NaCNBH<sub>3</sub>, y además se probaron concentraciones incluso 20.000 veces más bajas que las utilizadas *in vitro* para formar aductos estables (Israel et al., 1986; Lumeng et al., 1991; Patel et al., 2005). La figura 5.1 muestra la detección de aductos de proteína-acetaldehído estables en cerebro de rata inyectada con una dosis de etanol de 1 g/kg i.p., sólo cuando se agregó NaCNBH<sub>3</sub> *in vitro* en concentración 0,05 mM ó 0,5 mM (también en concentración 1 mM, datos no mostrados). Los aductos detectados son formados principalmente por una proteína de 32 kDa. No se detectó aductos cuando se incubó en ausencia de NaCNBH<sub>3</sub>, ni tampoco al utilizar concentraciones más altas de este agente, como 10 mM ó 100 mM. Cabe destacar que la proteína de 54 kDa es reconocida inespecíficamente por el suero inmune anti-aductos, por lo que los controles negativos de los siguientes experimentos generalmente mostrarán la detección de esta proteína.

Por otra parte, la administración de NaCNBH<sub>3</sub> en concentración final 0,05 mM, 0,5 mM ó 1 mM por vía endovenosa no fueron letales para la rata ni produjeron pérdida del reflejo de posición (se consideró como volumen de distribución para el NaCNBH<sub>3</sub> el 70% del peso de la rata). De estas tres concentraciones, se decidió trabajar con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM.



**Fig. 5.1** El NaCNBH<sub>3</sub> agregado *in vitro* en concentración 0,05 mM y 0,5 mM permite estabilizar los aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en cerebro total de rata luego de una dosis aguda de etanol. Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído estables formados en cerebro total de rata tratada con: etanol (1g/kg i.p.), luego de 30 minutos su cerebro fue diseccionado en partes iguales y cada sección fue incubada con NaCNBH<sub>3</sub> en concentraciones 0; 0,05 mM; 0,5 mM; 10 mM ó 100 mM durante 30 minutos en hielo. Las flechas indican: (a) la formación de aductos por una proteína de aproximadamente 32 kDa sólo cuando se utilizó NaCNBH<sub>3</sub> 0,05 mM y 0,5 mM (b) la detección de una proteína de aproximadamente 54 kDa que sería reconocida inespecíficamente por el anticuerpo. Para cada condición se cargaron 20 µg de proteínas totales.

Para sumar evidencias sobre el uso de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM como estabilizador de aductos de proteína-acetaldehído en cerebro de rata luego de una dosis de etanol: (a) se descartó que el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM provoque la formación de aductos estables en ausencia de acetaldehído, y (b) se estudió si el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM permite la formación de aductos en todo el rango de concentraciones de acetaldehído que se espera encontrar a nivel cerebral luego de una dosis de etanol (incluyendo el rango entre 6 y 90 µM). La figura 5.2 muestra que en homogeneizados de cerebro, la incubación con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM no indujo formación de aductos estables, y por otra parte, el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM permitió la formación de aductos cuando el acetaldehído fue agregado en concentraciones entre 0 y 200 µM, por lo que esta concentración de NaCNBH<sub>3</sub> sería adecuada para la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído en el rango de concentraciones reforzantes de acetaldehído.



**Fig. 5.2.** El NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM no induce *per se* la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables *in vitro*, y permite la formación de aductos estables en el rango de concentraciones reforzantes de acetaldehído. Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído en homogeneizados de cerebro de rata incubados con acetaldehído 0, 20, 40, 100 ó 200 μM en presencia o ausencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, durante 30 minutos en hielo. Para cada condición, se cargaron 20 μg de proteínas totales de homogeneizado de cerebro.

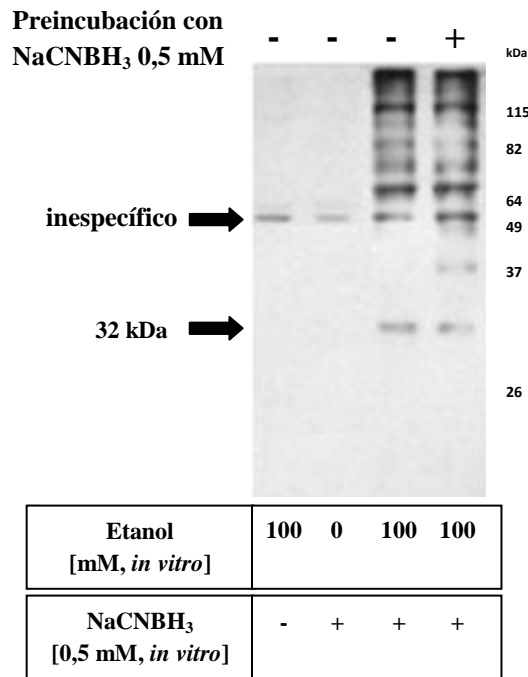
Cabe destacar que a diferencia de los estudios *in vivo* con estabilización de aductos de proteína-acetaldehído *in vitro*, no sólo se detectó la formación de aductos estables con la proteína de 32 kDa (ver figura 5.1), sino que con la mayor parte de las proteínas cerebrales.

### 5.1.2. Evaluación del efecto del NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM en la formación cerebral de acetaldehído a partir de etanol (*in vitro*)

Se evaluó si el uso de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM como agente estabilizador de aductos altera, directa o indirectamente, la formación de acetaldehído a partir de etanol en homogeneizados de cerebro. Si esto ocurriera, se esperaría que al preincubar un homogeneizado de cerebro con NaCNBH<sub>3</sub>



0,5 mM, existiera una variación en la cantidad de acetaldehído generada a partir de etanol en comparación con un homogeneizado de cerebro que no se preincuba con NaCNBH<sub>3</sub>. Como muestra la figura 5.3, la formación de aductos de proteína-acetaldehído en ambos casos es similar, por lo que el NaCNBH<sub>3</sub> no altera la formación de acetaldehído a partir del etanol en homogeneizados de cerebro.

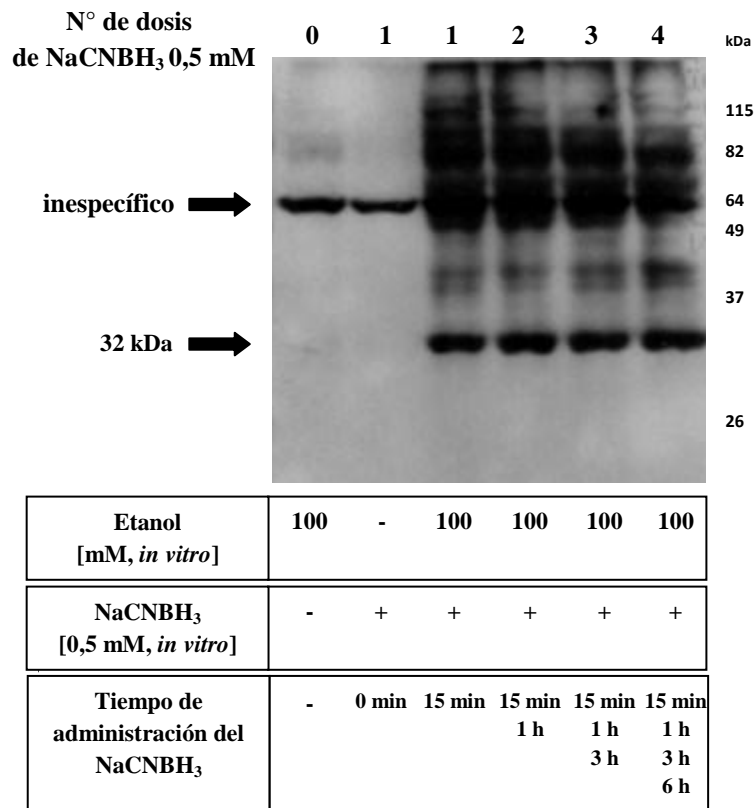


**Fig. 5.3. El NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM no afecta la generación cerebral de acetaldehído a partir de etanol (*in vitro*).** Se comparó por Western blot la formación de aductos estables en un homogeneizado de cerebro preincubado durante 30 minutos a 37°C con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM y luego incubado con etanol 100 mM durante 6 horas también a 37°C, con la formación de aductos estables en un homogeneizado de cerebro incubado con etanol 100 mM y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM durante 6 horas a 37°C. La reacción se detuvo a las 6 horas del comienzo del metabolismo del etanol, agregando aminotriazol al medio. En ambos casos se encontró similar formación de aductos. Para cada condición se cargaron 20 µg de proteínas totales.

### 5.1.3. Estimación del tiempo en que el NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM permite la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído (*in vitro*)

Como muestran los resultados anteriores, la formación de aductos estables no sólo sería dependiente de la presencia de NaCNBH<sub>3</sub>, sino que también de la concentración de esta molécula en el medio en que interaccionan el acetaldehído y las proteínas. Por lo tanto, estudios que requieran la formación de aductos estables con el acetaldehído generado durante un tiempo

determinado de metabolización de etanol, deben considerar si la concentración de NaCNBH<sub>3</sub> inicial utilizada permite la formación de aductos durante todo ese tiempo o se debe agregar en dosis repetidas. Como muestra la figura 5.4, la cantidad de aductos estables detectados no varió cuando un homogeneizado de cerebro se incubó con etanol 100 mM durante 6 horas y con NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM agregado en una, dos, tres o cuatro dosis a diferentes tiempos. Este resultado puede indicar que: (i) la dosis inicial de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM sería suficiente para detectar el acetaldehído generado durante 6 horas de metabolismo del etanol, (ii) sólo hay una cantidad finita de proteínas que pueden formar aductos, y por esto en todos los casos se encuentra un máximo de aductos formados. Por esto, es necesario evaluar si las proteínas pueden seguir captando acetaldehído durante las 6 horas de metabolismo del etanol.



**Fig. 5.4.** La formación de aductos de proteína-acetaldehído es independiente del número de dosis de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM agregadas a un homogeneizado de cerebro que durante 6 horas de metabolización del etanol. Se comparó por Western blot la formación de aductos estables en un homogeneizado de cerebro incubado con etanol 100 mM durante 6 horas a 37°C, cuando se agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM en una, dos, tres o cuatro dosis agregadas a diferentes tiempos según se indica. La reacción se detuvo a las 6 horas del comienzo del metabolismo del etanol, agregando aminotriazol al medio de incubación. En todos los casos se encontró la misma formación de aductos. Para cada condición se cargaron 20 µg de proteínas totales.

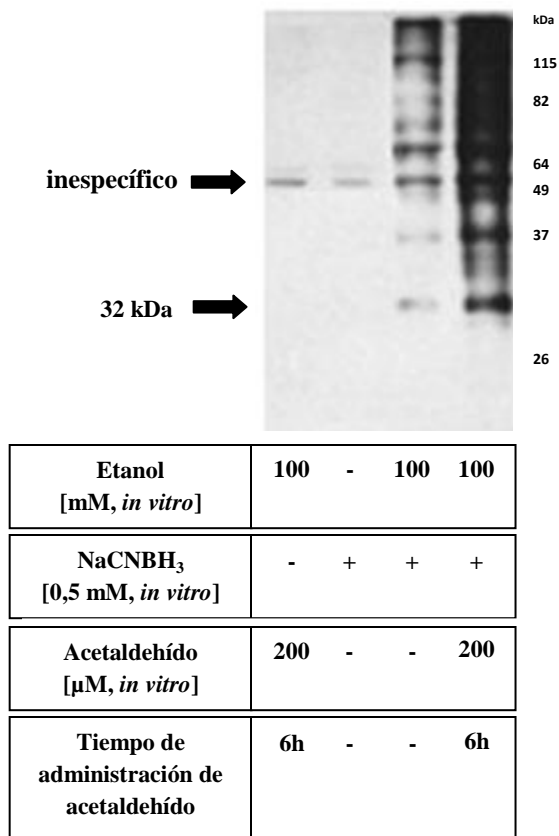
#### **5.1.4. Evaluación de la posible saturación de las proteínas cerebrales para formar aductos estables con el acetaldehído (*in vitro*)**

Se evaluó la capacidad de las proteínas de un homogeneizado de cerebro para formar aductos con el acetaldehído formado por la metabolización de etanol 100 mM durante 6 horas. Si la cantidad de proteínas cerebrales capaces de formar aductos es limitada, luego de un tiempo no podrían captar más acetaldehído y existiría un máximo de aductos formados, en cambio, si existe un exceso de proteínas disponibles para formar aductos no existiría tal saturación. La figura 5.5 muestra que las proteínas de un homogeneizado de cerebro incubado durante 6 horas con etanol 100 mM y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM fueron capaces de captar acetaldehído 200 μM agregado al medio de incubación incluso 6 horas después del comienzo del metabolismo del etanol. Esto indica que durante las 6 horas que se metabolizó el etanol, hubo proteínas disponibles para captar acetaldehído, y que por lo tanto, la cantidad de aductos detectados durante este tiempo corresponde a una acumulación de acetaldehído en forma de aductos de proteína-acetaldehído.

#### **5.2. Evaluación de la vía de administración del NaCNBH<sub>3</sub> para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en el cerebro de ratas luego de una dosis aguda de etanol**

Para lograr la formación de aductos estables *in vivo* con el acetaldehído generado a nivel cerebral luego de una dosis aguda de etanol, se debe integrar al contexto cerebral al NaCNBH<sub>3</sub> en las condiciones de concentración anteriormente determinadas *in vitro* (sección 5.1.). La entrada de sustancias hacia el cerebro se encuentra altamente controlada por la barrera hematoencefálica, y sólo pueden ingresar libremente moléculas lipofílicas pequeñas (Redzik, 2011). Aunque el NaCNBH<sub>3</sub> disociado en Na<sup>+</sup> y CNBH<sub>3</sub><sup>-</sup>, al ser una molécula polar, probablemente no podría pasar libremente desde la sangre hacia el cerebro, se encontró formación *in vivo* de aductos de proteína-acetaldehído estables en el cerebro de 5 ratas a las que se les administró una dosis de etanol de 2 g/kg i.p., y una posterior dosis de NaCNBH<sub>3</sub> en una concentración final de 1 mM por vía endovenosa (datos no mostrados) (se tomó como volumen de distribución del NaCNBH<sub>3</sub> el 70% del peso de la rata). Esto podría explicarse porque el CNBH<sub>3</sub><sup>-</sup> se encuentra además como HCNBH<sub>3</sub>, y esta molécula al no estar cargada podría

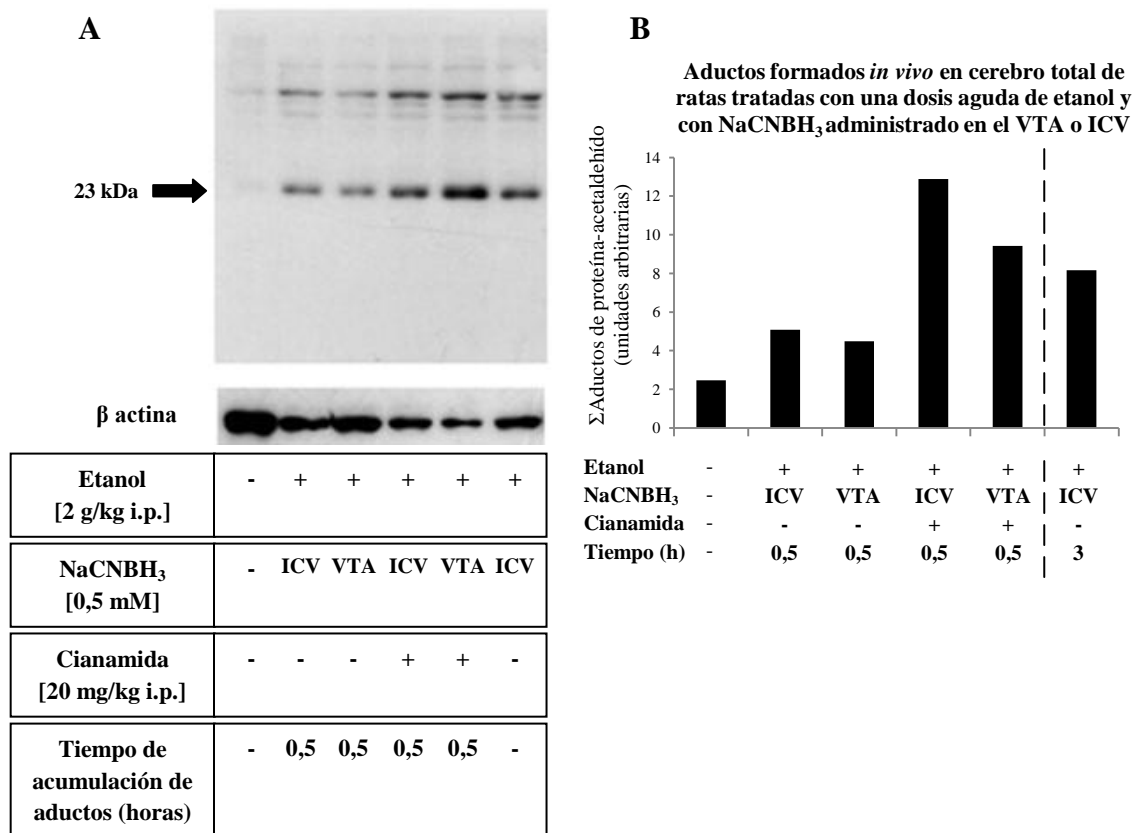
atravesar libremente la barrera hematoencefálica, permitiendo la formación de aductos. Sin embargo, se decidió no utilizar esta vía de administración debido a que no se conoce cuánto tiempo demora el NaCNBH<sub>3</sub> en llegar al cerebro, y además no se conoce qué dosis de NaCNBH<sub>3</sub> provoca efectos tóxicos en los animales por lo que no es recomendable su administración sistémica. Por esto, se evaluó la administración de NaCNBH<sub>3</sub> directamente en el cerebro de las ratas.



**Fig. 5.5 Las proteínas cerebrales pueden captar acetaldehído para formar aductos estables durante 6 horas de metabolismo de etanol (*in vitro*).** Se comparó por Western blot la formación de aductos en un homogeneizado de cerebro incubado con etanol 100 mM y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM durante 6 horas a 37°C, con la que hubo en un homogeneizado de cerebro incubado también con etanol 100 mM y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM durante 6 horas a 37°C, pero al que además se les agregó acetaldehído 200 μM a las 6 horas del comienzo del metabolismo del etanol. Todas las reacciones se detuvieron a las 6 horas del metabolismo del etanol, agregando aminotriazol al medio de incubación. Durante las 6 horas del metabolismo de etanol, hubo proteínas capaces de captar el acetaldehído en forma de aductos de proteína-acetaldehído. Para cada condición se cargaron 20 μg de proteínas totales.

**5.2.1. Evaluación de la administración estereotáxica de  $\text{NaCNBH}_3$  intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en el cerebro total de ratas luego de una dosis de etanol 2 g/kg i.p.**

Se estudió si la administración de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM intracerebroventricular (ICV) permite la formación *in vivo* de aductos de proteína-acetaldehído estables en el cerebro de las ratas luego de administrarles una dosis de etanol 2 g/kg i.p.. Debido a que uno de los propósitos de esta investigación es detectar aductos de proteína-acetaldehído específicamente en el VTA, se analizó paralelamente si la administración de  $\text{NaCNBH}_3$  directamente en esta zona cerebral también permite la estabilización de aductos de proteína-acetaldehído en el cerebro total de las ratas. Como muestra la figura 5.6, se detectó la formación de aductos estables en el cerebro total de ratas tratadas con etanol 2 g/kg i.p., cuando posteriormente se les administró  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM ICV o directamente en el VTA y se permitió la acumulación de aductos durante 30 minutos. La cantidad de aductos detectados fue similar en ambos casos, por lo que ambos tipos de administración permiten la estabilización de aductos *in vivo* con igual potencia. Cuando ratas fueron pretratadas con cianamida 20 mg/kg i.p. (inhibidor de la ALDH2 mitocondrial), y luego se les administró etanol 2 g/kg i.p. y  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM ICV o en el VTA, se detectó un aumento en la cantidad de aductos estables en comparación con las ratas no tratadas con cianamida, por lo que la técnica permite diferenciar la cantidad de acetaldehído presente en el tejido. Esto último es confirmado ya que al tratar una rata con etanol 2 g/kg i.p. y con  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM ICV, pero se permite la acumulación de aductos durante 3 horas, también se pudo detectar una mayor cantidad de aductos en comparación con las ratas que en las que se permitió la formación de aductos durante 30 minutos. Con todos los resultados mostrados anteriormente, se concluyó que es posible detectar la formación de aductos de proteína-acetaldehído en el cerebro de ratas luego de una dosis de etanol (2 g/kg i.p.), si posteriormente se administra al animal una concentración final de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM en el líquido cefalorraquídeo, o directamente en el VTA.



**Fig. 5.6.** La administración de NaCNBH<sub>3</sub> intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) permite la formación *in vivo* de aductos de proteína-acetaldehído estables en el cerebro de rata luego de una administración aguda de etanol 2 g/kg i.p.. Además, la técnica permite detectar diferencias en la concentración de acetaldehído presente en el tejido.

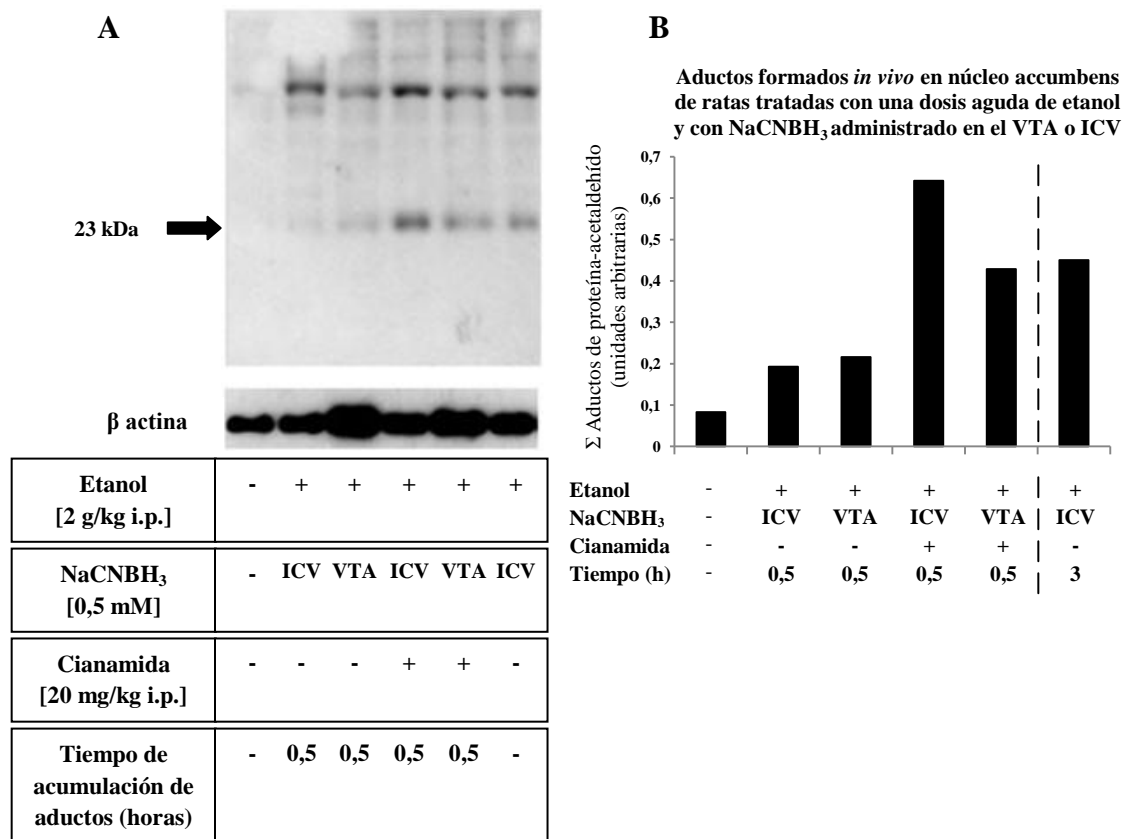
(A) Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído estables que se acumularon durante 30 minutos en el cerebro total de ratas por la administración de una dosis de etanol de 2 g/kg i.p. seguida a los 15 minutos por una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV o en el VTA. Para determinar si la técnica permite detectar diferencias en la concentración de acetaldehído presente en el cerebro total, se detectaron: (i) los aductos estables que se acumularon durante 30 minutos cuando ratas fueron pretratadas con cianamida 20 mg/kg (inhibidor de ALDH2 mitocondrial), y posteriormente se les administró una dosis de etanol 2 g/kg i.p., seguida a los 15 minutos por una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV o en el VTA, (ii) los aductos estables que se acumularon durante 3 horas cuando una rata se trató con una dosis de etanol 2 g/kg i.p. seguida de una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV.

(B) Cuantificación en unidades arbitrarias de los aductos formados en las distintas condiciones. Se cuantificaron los pixeles de cada carril completo utilizando el programa Image J (por lo tanto, se cuantificó la totalidad de los aductos formados), y se normalizaron los datos con la cuantificación de β-actina en cada condición.

**5.2.2. Evaluación de la administración estereotáxica de NaCNBH<sub>3</sub> intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) para estabilizar aductos de proteína-acetaldehído formados *in vivo* en el núcleo accumbens de ratas luego de una dosis aguda de etanol 2 g/kg i.p.**

La figura 5.7 muestra la formación *in vivo* de aductos de proteína-acetaldehído estables en el núcleo accumbens de ratas tratadas con etanol 2 g/kg i.p. cuando se les administró NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM tanto por vía ICV como directamente en el VTA, y se permitió la acumulación de aductos durante 30 minutos. Al igual que en el cerebro total, ambos tipos de administración tuvieron la misma potencia para estabilizar aductos, ya que al comparar la cuantificación de los aductos que se acumularon en cada caso, se encontró similitud en los resultados. Además, se encontró que la técnica permite diferenciar concentraciones de acetaldehído que se encuentren presentes en el tejido, ya que ratas que fueron pretratadas con cianamida 20 mg/kg (inhibidor de la ALDH2 mitocondrial) formaron mayor cantidad de aductos que ratas sin tratar con este agente. Esto fue nuevamente confirmado, porque al aumentar el tiempo que se permite la acumulación de aductos de 30 minutos a 3 horas, también hubo un aumento en la cantidad de aductos estables detectados.

Los resultados del punto 5.2.1 y 5.2.2 muestran que la administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV o directamente en el VTA permiten la estabilización de aductos en el cerebro total y específicamente en el núcleo accumbens luego de una dosis de etanol 2 g/kg i.p.. Para lograr la estabilización de aductos formados en el cerebro total y VTA de rata luego de una dosis de etanol de 1 g/kg i.p. (dosis de etanol equivalente a la que es altamente autoadministrada en el VTA de ratas, a diferencia de la dosis equivalente a 2 g/kg i.p. (Rodd et al., 2005)), se decidió utilizar como vía de administración de NaCNBH<sub>3</sub> la inyección ICV, debido a que la administración directamente en el VTA podría causar daño mecánico en el tejido y disminuir la capacidad de metabolización de etanol de esta zona cerebral.



**Fig. 5.7.** La administración de NaCNBH<sub>3</sub> intracerebroventricular (ICV) o en el área del tegmento ventral (VTA) permite la formación *in vivo* de aductos de proteína-acetaldehído estables en el núcleo accumbens de rata luego de una administración aguda de etanol 2 g/kg i.p. Además, la técnica permite detectar diferencias en la concentración de acetaldehído presente en el tejido.

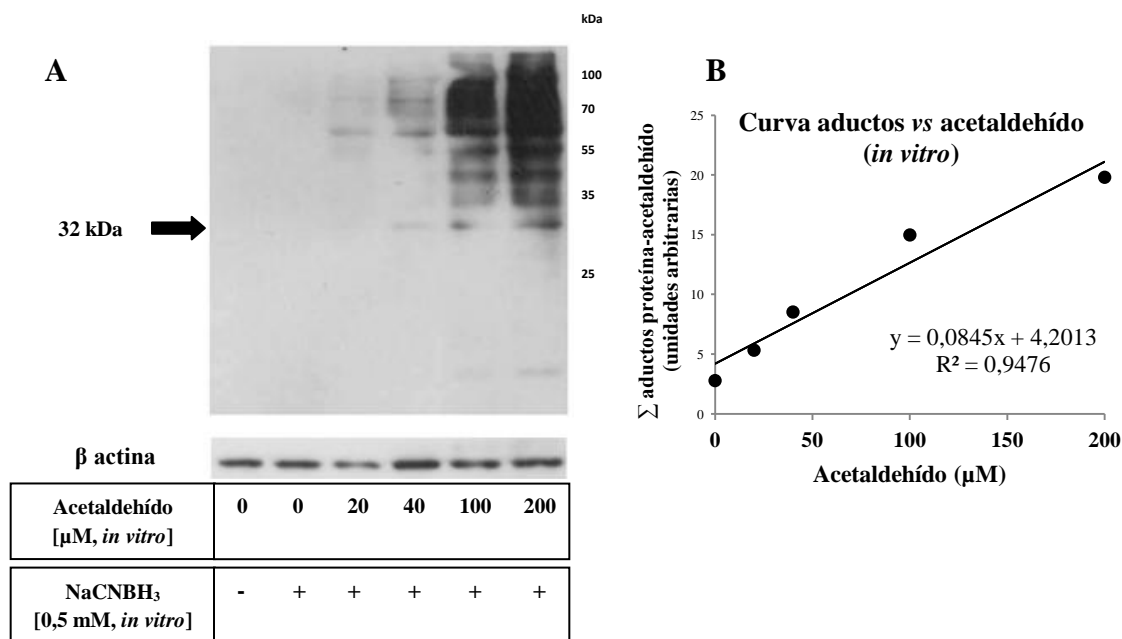
(A) Western blot para detección de aductos de proteína-acetaldehído estables que se acumularon durante 30 minutos en el núcleo accumbens de ratas por la administración de una dosis de etanol de 2 g/kg i.p. seguida a los 15 minutos por una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV o en el VTA. Para determinar si la técnica permite detectar diferencias en la concentración de acetaldehído presente en el núcleo accumbens, se detectaron: (i) los aductos estables que se acumularon durante 30 minutos cuando ratas fueron pretratadas con cianamida 20 mg/kg (inhibidor de ALDH2 mitocondrial), y posteriormente se les administró una dosis de etanol 2 g/kg i.p., seguida a los 15 minutos por una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV o en el VTA, (ii) los aductos estables que se acumularon durante 3 horas cuando una rata se trató con una dosis de etanol 2 g/kg i.p. seguida de una administración de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV.

(B) Cuantificación en unidades arbitrarias de los aductos formados en las distintas condiciones. Se cuantificaron los píxeles de cada carril completo utilizando el programa Image J (por lo tanto, se cuantificó la totalidad de los aductos formados), y se normalizaron los datos con la cuantificación de β-actina en cada condición.



### 5.3. Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de niveles de acetaldehído presentes en un tejido

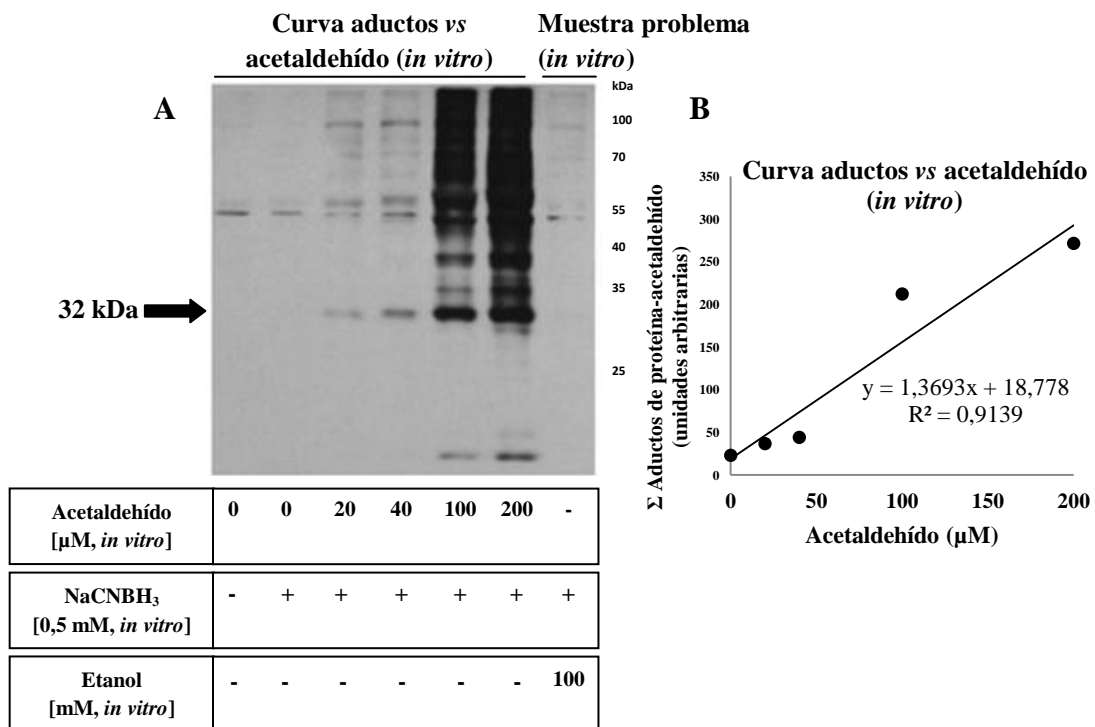
Para determinar la concentración de acetaldehído presente en el cerebro total y en el VTA de rata luego de una dosis reforzante de etanol, se debe determinar si la formación de aductos puede ser utilizada como medida indirecta de la concentración de acetaldehído presente en el tejido. Utilizando el programa Image J, se cuantificaron en unidades arbitrarias los resultados de un Western blot de detección de aductos de proteína-acetaldehído en homogeneizados de cerebro incubados con concentraciones crecientes de acetaldehído (0, 20, 40, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM, durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Como muestra la figura 5.8, la formación de aductos aumenta en relación directa con la concentración de acetaldehído que se agregó al medio de incubación, lo que indica que la cuantificación de aductos de proteína-acetaldehído puede ser utilizada como medida indirecta de la cantidad de acetaldehído que se encuentre presente en el medio.



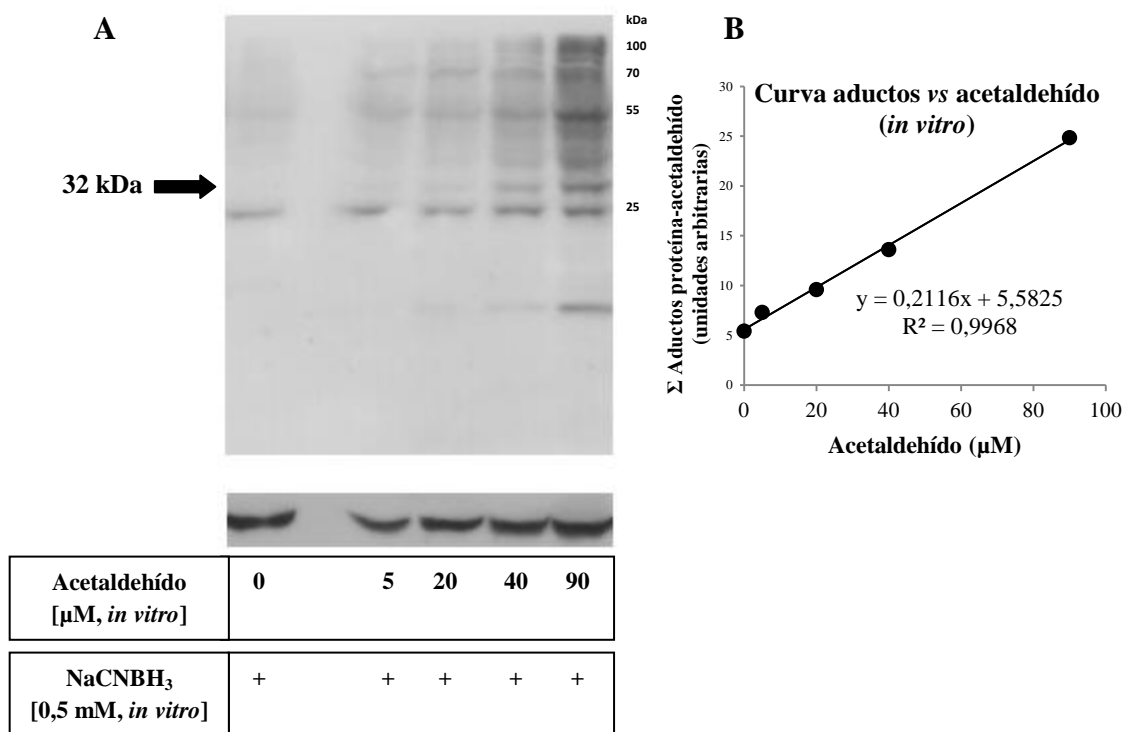
**Fig. 5.8.** Existe relación directa entre la concentración de acetaldehído agregada a homogeneizados de cerebro y la cantidad de aductos de proteína-acetaldehído formados. (A) Western blot para detección de aductos en homogeneizado de cerebro de rata incubado con incubados con 0, 20, 40, 100 ó 200  $\mu\text{M}$  de acetaldehído en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM, durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Para cada condición se cargaron 7  $\mu\text{g}$  de proteínas totales. (B) Cuantificación de los aductos, en unidades arbitrarias, con respecto a la cantidad de acetaldehído agregada al homogeneizado de cerebro. Se cuantificaron los píxeles de cada carril completo utilizando el programa Image J y se normalizaron los datos con la cuantificación de  $\beta$ -actina en cada condición.

Existen estudios en que se ha detectado y se han estimado los niveles de acetaldehído producidos por la metabolización del etanol en homogeneizados de cerebro, utilizando la técnica de cromatografía de gases “head-space” (Coldwell et al., 1971; Eriksson et al., 1977; Aragon et al., 1992 (b); Gill et al., 1992). En el estudio de Gill et al, (1992) se encontró que al incubar homogeneizados de cerebro con etanol 50 mM durante 15 minutos, se genera una concentración de acetaldehído de aproximadamente 3  $\mu$ M. En el presente estudio, se quiso comparar estos resultados con los obtenidos utilizando la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables como medida indirecta de una concentración de acetaldehído, para de esta forma sumar validez a esta metodología. Se cuantificaron, en unidades arbitrarias, los aductos formados en un homogeneizado de cerebro incubado con etanol 100 mM durante 15 minutos (tiempo al cual se agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM y se detuvo la reacción), y en paralelo se cuantificaron los aductos formados en homogeneizados de cerebro incubados con concentraciones crecientes de acetaldehído (en presencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM) obteniéndose una curva estándar que relaciona una concentración de acetaldehído con la formación de aductos (figura 5.9). La ecuación que describe a esta curva se utilizó para estimar la concentración de acetaldehído presente en el homogeneizado de cerebro incubado con etanol 100 mM, encontrándose una concentración de acetaldehído a los 15 minutos del comienzo del metabolismo del etanol de 6,32  $\mu$ M, resultado que coincide con lo encontrado en el estudio de Gill et al. (1992). Esto da una nueva evidencia que apoya que la formación de aductos de proteína-acetaldehído estables puede utilizarse como medida indirecta de la concentración de acetaldehído presente en el medio. Sin embargo, este tipo de curvas sólo pueden ser utilizadas para determinar la concentración de acetaldehído presente en un medio en un tiempo determinado. Por esto, para determinar la concentración promedio de acetaldehído que existe en muestras en que se han acumulado aductos de proteína-acetaldehído en el tiempo (como las muestras de las secciones 5.2.1 y 5.2.2, en las que durante 30 minutos se acumuló el acetaldehído en forma de aductos), se debe obtener una curva que relacione la cuantificación de una acumulación de aductos de proteína-acetaldehído con una concentración de acetaldehído. Para esto, se determinó si al incubar homogeneizados de cerebro con diferentes concentraciones conocidas de acetaldehído (del rango de concentraciones reforzantes), mantenidas constantes durante 30 minutos a 37°C, existe una relación directa entre la cantidad de aductos de proteína-acetaldehído acumulados y la concentración de acetaldehído que se encontraba en el medio. La figura 5.10 muestra la detección por Western blot de la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído estables en

las muestras anteriormente descritas, y su cuantificación, en unidades arbitrarias, utilizando el programa Image J. Existe una relación directa entre la concentración de acetaldehído que se mantuvo constante en el homogeneizado de cerebro durante 30 minutos y la cantidad de aductos estables acumulados durante ese tiempo. Resultados similares se encontraron al incubar homogeneizados de VTA en las condiciones anteriormente mencionadas (ver figura 5.12) por lo que este tipo de curva es adecuada para estimar los niveles de acetaldehído que se encuentran en el cerebro total y en el VTA de ratas tratadas con una dosis aguda de etanol.



**Fig. 5.9. Estimación de niveles de acetaldehído utilizando como medida indirecta la formación de aductos de proteína-acetaldehído.** Se incubó un homogeneizado de cerebro con etanol 100 mM y a los 15 minutos se agregó NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, y se detuvo la reacción. En paralelo, a homogeneizados de cerebro se les agregó acetaldehído 0, 20, 40, 100 ó 200 μM en presencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, y se incubó por 1 minuto a 37°C, obteniéndose así la curva de aductos vs acetaldehído. La figura A muestra la detección por Western blot de los aductos formados en cada condición. En cada condición se cargaron 20 μg de proteínas totales. La figura B muestra la gráfica obtenida al cuantificar por Image J la totalidad de aductos formados en cada condición de la curva de aductos vs acetaldehído. Utilizando la ecuación que define a esta curva, se encontró una concentración de acetaldehído de 6,32 μM en el homogeneizado de cerebro luego de 15 minutos del comienzo de la metabolización del etanol 100 mM, resultado que coincide con lo reportado en la literatura para homogeneizados de cerebro incubados en condiciones similares, pero que utilizan cromatografía de gases head-space para medir el acetaldehído.

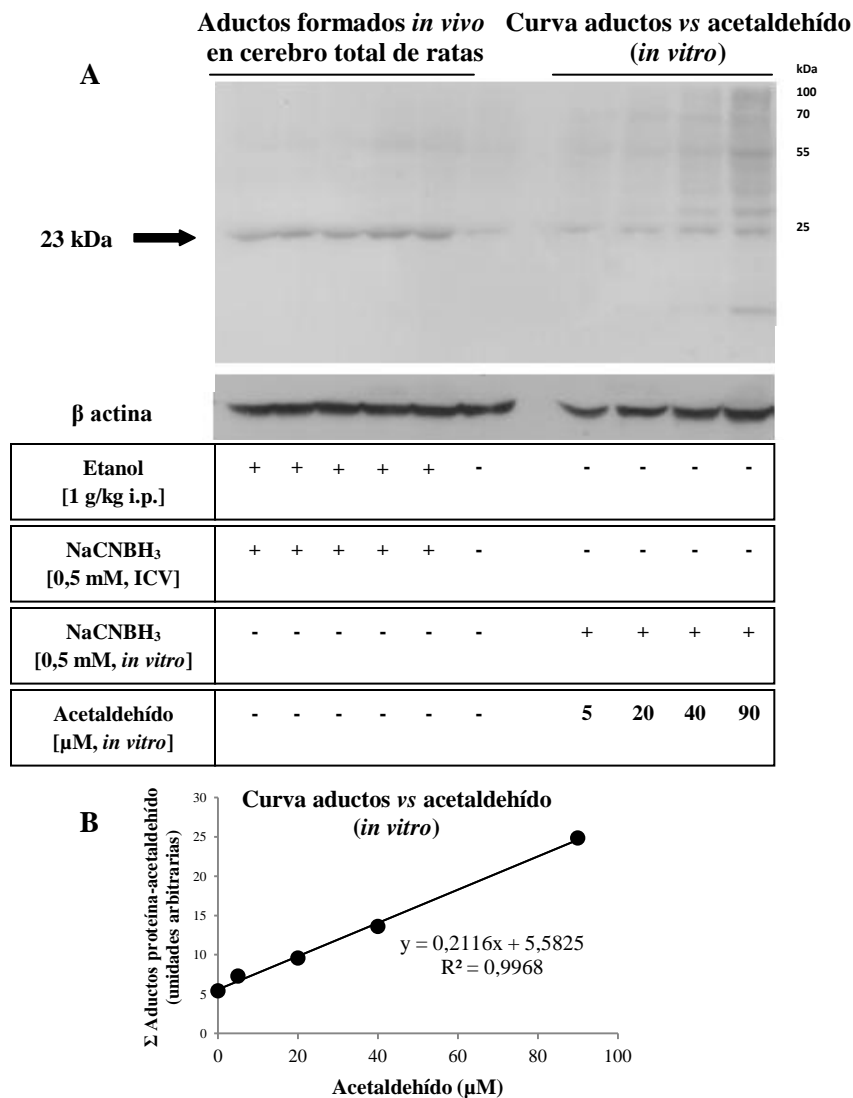


**Fig. 5.10.** Existe una relación directa entre la concentración de acetaldehído mantenida durante 30 minutos en un homogeneizado de cerebro y la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído estables durante ese tiempo. Homogeneizados de cerebro se incubaron con diferentes concentraciones acetaldehído (0, 5, 20, 40 ó 90  $\mu\text{M}$ ; rango de concentraciones reforzantes) mantenidas constantes durante 30 minutos, en presencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM. La figura A muestra la detección por Western blot de los aductos estables formados en cada condición. En cada condición se cargaron 7  $\mu\text{g}$  de proteínas totales. La figura B muestra la curva obtenida de la cuantificación en unidades arbitrarias de los aductos formados en cada condición de la curva de concentración de acetaldehído mantenida durante 30 minutos en un homogeneizado de cerebro vs. la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído, utilizando el programa Image J (datos normalizados contra  $\beta$ -actina). Se encontró que existe una relación lineal entre la concentración de acetaldehído mantenida durante los 30 minutos y la cantidad de aductos de proteína-acetaldehído estables acumulados durante ese tiempo.

#### 5.4. Estimación de los niveles del acetaldehído alcanzados *in vivo* en el cerebro total y VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p.

Para estimar la concentración de acetaldehído que se alcanza en el cerebro total y en el VTA por una dosis de etanol 1 g/kg i.p., a 5 ratas se les administró conjuntamente NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM intracerebroventricular (ICV) y se permitió la formación de aductos durante 30 minutos para luego obtener sus cerebros y VTAs. En paralelo, homogeneizados de cerebro o de VTA

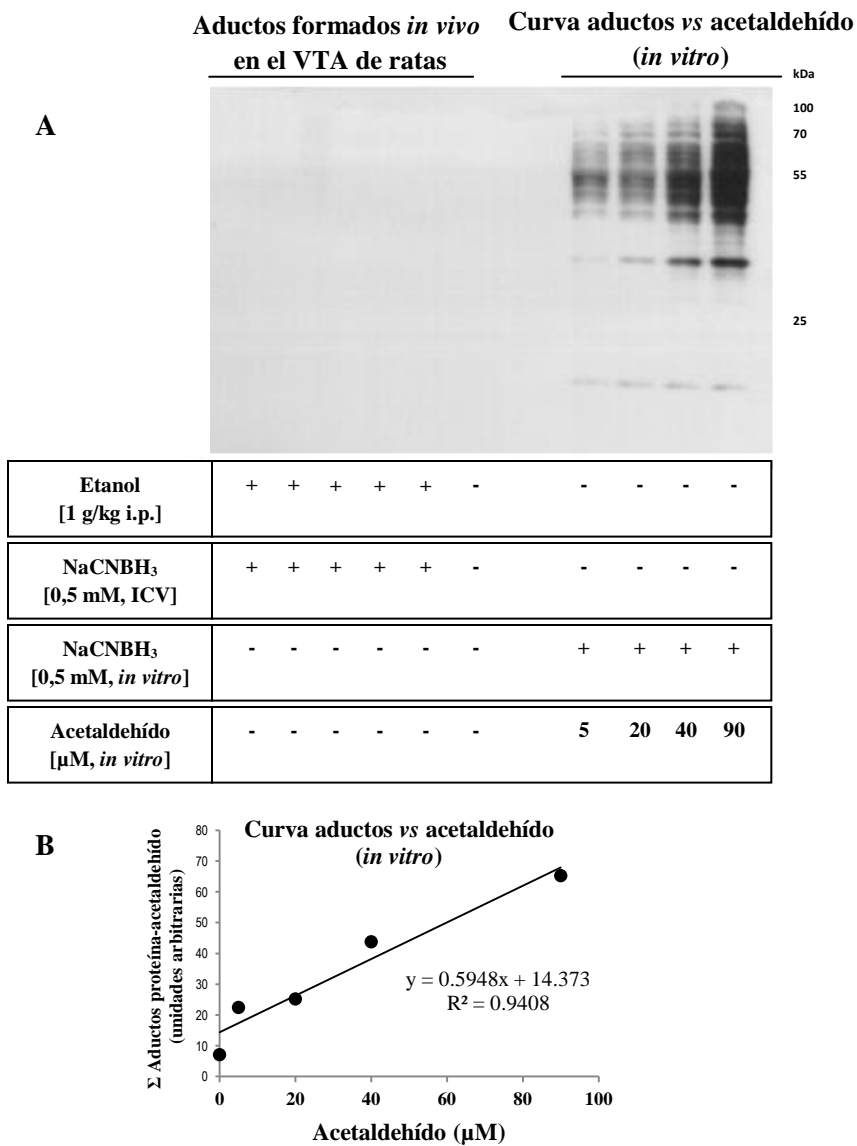
se incubaron con acetaldehído 0, 5, 20, 40 ó 90  $\mu\text{M}$  (rango de concentraciones reforzantes descritas por Rodd-Henricks et al., 2002) mantenidas constantes durante 30 minutos y en presencia de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM. La figura 5.11 muestra la detección de aductos de proteína-acetaldehído en los cerebros de los 5 animales analizados (principalmente por una proteína de 23 kDa), y además en las muestras incubadas para obtener la curva de aductos vs acetaldehído que permite la estimación de la concentración de acetaldehído presente en el cerebro. Al cuantificar por Image J la totalidad de los aductos detectados, se estimó que la concentración de acetaldehído alcanzada en el cerebro total de las ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p. es de  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5). Si esta concentración se alcanzara también en el VTA, probablemente tendría un efecto reforzante en los animales. Sin embargo, como muestra la figura 5.12, no se detectó aductos de proteína-acetaldehído en el VTA de estos animales, por lo que no fue posible estimar la concentración de acetaldehído alcanzada en esta zona cerebral por una dosis reforzante de etanol de 1 g/kg i.p.. Resultados similares se encontraron en ratas tratadas con una dosis de etanol 2 g/kg i.p. (datos no mostrados). Una posible explicación de este resultado, es que en el VTA no se forme acetaldehído y que por eso no se hayan detectado aductos, sin embargo esto es poco probable ya que en el VTA se expresa la catalasa (Moreno et al., 1995), y existen evidencias indirectas de que esta se encuentra fisiológicamente activa (Karahanian et al., 2011; Quintanilla et al., 2012). Esto hace que tome más fuerza una segunda posible explicación, que apunta a que en el VTA al ser una zona altamente dopaminérgica, el acetaldehído generado podría haber condensado con la dopamina antes de que pudiera formar aductos con las proteínas. Lo interesante de esto, es que este producto de condensación, el salsolinol (Yamanaka et al., 1970), ha sido postulado como la molécula efectora final del efecto reforzante del etanol (Rodd et al. 2008, Hipólito et al., 2012), por lo que esto podría dar evidencia indirecta de la formación *in vivo* de salsolinol en el VTA luego de una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p..



**Fig. 5.11.** En el cerebro total de rata, se estima que se alcanza *in vivo* una concentración de acetaldehído aproximadamente 6 μM por una dosis de etanol 1 g/kg i.p..

**Aductos formados *in vivo* en cerebro total de ratas:** 5 ratas se trataron con etanol 1 g/kg i.p. y luego de 15 minutos se les administró NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV para permitir la formación de aductos de proteína-acetaldehído durante 30 minutos. Pasado este período, se obtuvieron sus cerebros y se analizó la formación de aductos. **Curva aductos vs acetaldehído (*in vitro*):** Homogeneizados de cerebro se incubaron con diferentes concentraciones acetaldehído (0, 5, 20, 40 ó 90 μM; rango de concentraciones reforzantes) mantenidas constantes durante 30 minutos, en presencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM.

La figura A muestra la detección por Western blot de los aductos estables formados en cada condición. En cada condición se cargaron 7 μg de proteínas totales. La figura B muestra la curva obtenida de la cuantificación en unidades arbitrarias de los aductos formados en cada condición de la curva de concentración de acetaldehído mantenida durante 30 minutos en un homogeneizado de cerebro *vs.* la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído, utilizando el programa Image J (datos estandarizados contra β-actina). Utilizando la ecuación que describe la curva de aductos vs acetaldehído, se estimó que en el cerebro total de rata se alcanza una concentración de acetaldehído aproximadamente 6 μM por una dosis de etanol 1g/kg i.p..



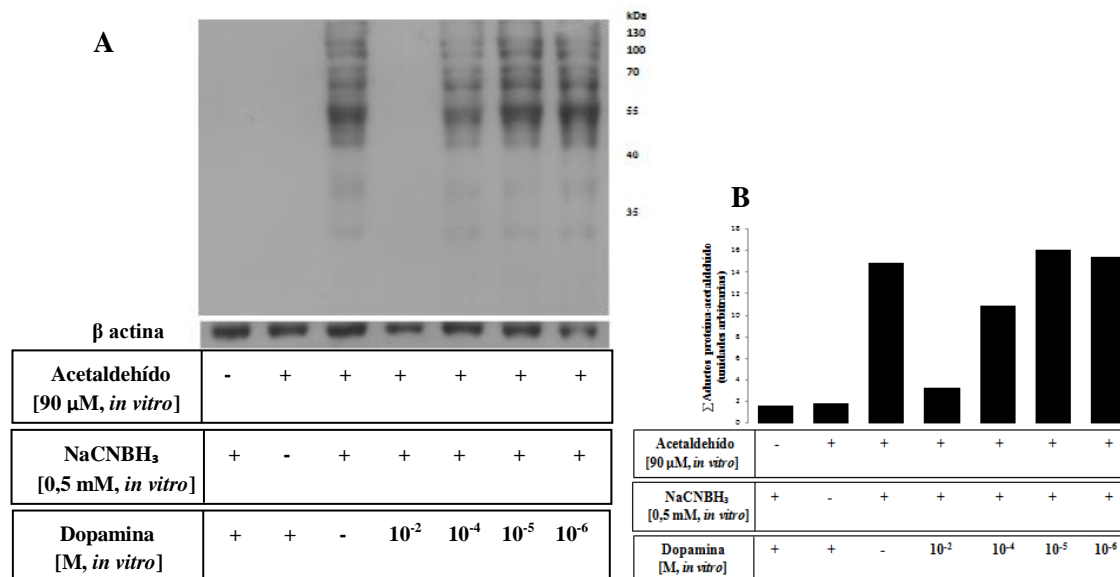
**Fig. 5.12.** No se detectó aductos de proteína-acetaldehído en el VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p., por lo que no se pudo estimar la concentración de acetaldehído alcanzada *in vivo* en esta zona cerebral.

**Aductos formados *in vivo* en el VTA de ratas:** 5 ratas se trataron con etanol 1 g/kg i.p. y luego de 15 minutos se les administró NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV para permitir la formación de aductos de proteína-acetaldehído durante 30 minutos. Pasado este período, se obtuvieron sus VTAs y se analizó la formación de aductos. **Curva aductos vs acetaldehído (*in vitro*):** Homogeneizados de VTA se incubaron con diferentes concentraciones acetaldehído (0, 5, 20, 40 ó 90 μM; rango de concentraciones reforzantes) mantenidas constantes durante 30 minutos, en presencia de NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM.

La figura A muestra la detección por Western blot de los aductos estables formados en cada condición. En cada condición se cargaron 7 μg de proteínas totales. La figura B muestra la curva obtenida de la cuantificación en unidades arbitrarias de los aductos formados en cada condición de la curva de concentración de acetaldehído mantenida durante 30 minutos en un homogeneizado de VTA vs. la acumulación de aductos de proteína-acetaldehído, utilizando el programa Image J.

### 5.5. Competencia entre la formación de aductos de proteína-acetaldehído y la formación de salsolinol en homogeneizados de cerebro que se les agrega dopamina, NaCNBH<sub>3</sub> y acetaldehído

Los resultados anteriores muestran la presencia de aductos en el cerebro de ratas tratadas con etanol 1 ó 2 g/kg i.p. y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV, pero la ausencia de aductos en sus VTA. Se evaluó la posibilidad de que en el VTA la formación de aductos no sea favorecida por la presencia de dopamina, molécula que condensaría con el acetaldehído impidiendo la formación de aductos. La figura 5.13 muestra la formación de aductos en un homogeneizado de cerebro incubado con acetaldehído 90 μM y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, pero la ausencia de aductos en un homogeneizado de cerebro incubado en estas mismas condiciones pero en presencia de dopamina 10<sup>-2</sup> M (concentración en las vesículas de dopamina de las neuronas del VTA (Feinendegen et al., 2003)). Además, la formación de aductos disminuyó en un 28% en presencia de dopamina 10<sup>-4</sup> M. La presencia de dopamina 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-6</sup> M no afectó la formación de aductos. Estos resultados indican que la formación de aductos de proteína-acetaldehído puede verse afectada por la presencia de dopamina, y probablemente por esta razón en el VTA de ratas tratadas con etanol 1 ó 2 g/kg i.p. y NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM ICV no se detectó formación de aductos.



**Fig. 5.13. La formación de aductos de proteína-acetaldehído disminuye en presencia de dopamina.** Homogeneizados de cerebro se incubaron con acetaldehído 90 μM, NaCNBH<sub>3</sub> 0,5 mM, en presencia de dopamina entre 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-6</sup> M, durante 30 minutos a 37°C. La figura A muestra la detección por Western blot de los aductos estables formados en cada condición. En cada condición se cargaron 7 μg de proteínas totales. La figura B muestra la cuantificación, en unidades arbitrarias, de los aductos formados en cada condición utilizando el programa Image J.



## 6. DISCUSIÓN

La dependencia del alcohol es atribuida al refuerzo que esta sustancia causa en los consumidores. La mayor parte de las investigaciones al respecto indican que el efecto reforzante del alcohol estaría mediado por su metabolito primario, el acetaldehído. Esta molécula actuaría estimulando al sistema de recompensa, formado principalmente por neuronas dopaminérgicas cuyos somas se localizan en el área del tegmento ventral (VTA) y se proyectan hacia el núcleo accumbens. La evidencia indica que la generación de refuerzo ocurre cuando el acetaldehído es incorporado (por autoadministración del propio animal) al VTA en concentraciones entre 6 y 90  $\mu\text{M}$  (Rodd-Henricks et al., 2002). Sin embargo, aún no se conoce si luego de administrar a ratas una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p. (Imperato y Di Chiara, 1986)), se alcanza una concentración reforzante de acetaldehído en sus VTA, ya que hasta el momento no existían estudios que hubieran logrado siquiera detectar la generación de acetaldehído a nivel cerebral, probablemente porque su rápida metabolización dificultaba su detección.

En este estudio se elaboró una metodología que permite detectar el acetaldehído presente en un tejido utilizando un suero inmune que contiene anticuerpos que reconocen al acetaldehído como residuo en un aducto de proteína-acetaldehído. Esta técnica permitió detectar, por Western blot, el acetaldehído formado *in vivo* en el cerebro de las ratas (figura 5.6 y 5.11), y específicamente en el núcleo accumbens (figura 5.7), después de administrarles una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.). Además, se encontró que la formación de aductos se relaciona directamente con la concentración de acetaldehído agregada a un homogeneizado de cerebro (figuras 5.8, 5.9) o a un homogeneizado de VTA (figura 5.10), por lo que la cuantificación de aductos pudo ser utilizada como medida indirecta de la concentración de acetaldehído presente en ese tejido. Así, se estimó que la concentración de acetaldehído alcanzada en el cerebro total de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p. (dosis equivalente a la que es altamente autoadministrada en el VTA de las ratas (Rodd et al., 2005)) es de  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5). Si esta concentración se alcanzara también en el VTA, probablemente generaría refuerzo en los animales, ya que se encuentra en el rango de concentraciones reforzantes (Rodd-Henricks et al., 2002). Sin embargo, no se detectó aductos de proteína-acetaldehído en el VTA de animales tratados con etanol 1 g/kg i.p., por lo que no fue posible estimar la concentración de acetaldehído alcanzada en esta zona cerebral (figura 5.12). Resultados similares se encontraron al tratar ratas con etanol 2 g/kg i.p. (datos no

mostrados). La ausencia de aductos estables en el VTA de las ratas tratadas con etanol 1 ó 2 g/kg i.p. se debe probablemente a que la dopamina presente en esta zona cerebral condensa con el acetaldehído generado antes de que pudieran formarse aductos de proteína-acetaldehído estables (figura 5.13). El producto de condensación entre la dopamina y el acetaldehído es el salsolinol (Yamanaka et al., 1970), molécula que ha sido postulada como la efectora final del refuerzo por etanol (Rodd et al., 2008; Hipólito et al., 2012). Los resultados encontrados en este estudio dan una evidencia indirecta de que el salsolinol se formaría *in vivo* en el VTA luego de una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p..

### **6.1. Aductos de proteína-acetaldehído como medida indirecta de acetaldehído**

Hasta el momento, los estudios de detección de acetaldehído se habían realizado principalmente utilizando cromatografía de gases “head-space”. Con esta técnica, nunca se pudo detectar la generación de acetaldehído *in vivo* en el cerebro de las ratas luego de una dosis aguda de etanol, probablemente porque el acetaldehído se inactiva rápidamente. En este estudio, se evitó la inactivación del acetaldehído al estabilizar la reacción que éste tiene espontáneamente con las lisinas de las proteínas utilizando el agente reductor  $\text{NaCNBH}_3$ , y luego se detectó indirectamente el acetaldehído utilizando anticuerpos que reconocen al acetaldehído como residuo en un aducto de proteína-acetaldehído.

La función del  $\text{NaCNBH}_3$  es actuar como un reductor selectivo, provocando la reducción de las bases de Schiff formadas entre el acetaldehído y las proteínas para formar aductos estables, sin reducir el acetaldehído (figura 5.2). Sin embargo, este agente puede ser utilizado para formar aductos estables sólo en concentraciones aproximadamente menores o iguales a 1 mM, porque al utilizar concentraciones mayores no se detectó formación de aductos estables (figura 5.1). Esto se explicaría porque al aumentar la concentración de  $\text{NaCNBH}_3$ , aumenta conjuntamente la concentración de los contaminantes del reactivo, entre los que se encuentra el  $\text{NaBH}_4$ , un agente reductor fuerte que provocaría la reducción de las bajas concentraciones de acetaldehído generadas por el metabolismo cerebral del etanol antes de que pudiera formarse el aducto estable (Jentoft y Dearborn, 1979). La concentración de  $\text{NaCNBH}_3$  más baja que fue ensayada en este estudio y que permitió la formación de aductos estables fue de 0,05 mM (figura 5.1); como la

incubación se realizó en hielo, es probable que se requieran concentraciones de esta sustancia incluso menores para estabilizar aductos *in vivo*, donde la reacción transcurrirá a 37°C. Esto es apoyado porque al administrar 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM directamente en el VTA, hubo formación de aductos en el núcleo accumbens (figura 5.7) y en el resto del cerebro (figura 5.6), y para que esto ocurriera, el  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM debió haberse diluido para alcanzar el resto del cerebro. Una posibilidad, es que el  $\text{NaCNBH}_3$  haya difundido desde el VTA hacia el cuarto ventrículo, donde pudo diluirse en los 90  $\mu\text{L}$  de líquido cefalorraquídeo que en promedio tienen las ratas (Pardridge W. 2011). Si la cantidad de  $\text{NaCNBH}_3$  que se inyectó en el VTA se hubiera diluido en el todo el volumen de líquido cefalorraquídeo, su concentración en este líquido habría sido de 0,005 mM, que al parecer sería aún suficiente para lograr la estabilización de los aductos (ver sección 6.2). Sin embargo, el líquido cefalorraquídeo fluye con direccionalidad hacia la médula espinal, y como el núcleo accumbens se encuentra rostral al VTA, esto no explicaría la formación de aductos en esa zona cerebral. Una hipótesis más probable, es que el  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM haya difundido desde el VTA hacia la sangre, atravesando la barrera hematoencefálica (el  $\text{NaCNBH}_3$  tendría esta propiedad, ya que al ser administrado de forma endovenosa en ratas tratadas con alcohol, éste permitió la formación de aductos en sus cerebros). Como los vasos sanguíneos que rodean al VTA penetran hacia el cerebro, esta direccionalidad de la sangre permitiría que el  $\text{NaCNBH}_3$  alcanzara el núcleo accumbens. La concentración de  $\text{NaCNBH}_3$  que se alcanza al diluir 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM en el volumen total de sangre de las ratas (volumen de sangre en ratas = peso rata\*0,06 + 0,77 (Lee y Blaufox (1985), en promedio pesaban 300 g), es de 0,00003 mM, concentración que según estos resultados podría aún permitir la formación de aductos a 37°C.

Para generar aductos estables, tanto *in vivo* como *in vitro*, en este estudio se utilizó  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM. Debido a que esta es una sustancia reconocida como muy tóxica, se realizaron estudios para evaluar toxicidad previo a los estudios *in vivo*. Un estudio de viabilidad en astrocitos incubados con  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM durante 30 minutos mostró que aunque la viabilidad celular disminuyó en un 8%, esta toxicidad es revertida cuando el  $\text{NaCNBH}_3$  es agregado en presencia de acetaldehído 90  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados, n=1). Además, se demostró que esta sustancia en dicha concentración no altera el metabolismo del etanol (figura 5.3), por lo que estos resultados sugieren que la administración intracerebroventricular de  $\text{NaCNBH}_3$  0,5 mM sería adecuada para la generación *in vivo* de aductos estables en el cerebro de ratas tratadas con etanol.

La formación de aductos de proteína-acetaldehído depende principalmente del estado de protonación del grupo amino de las lisinas (Israel et al., 1988), y sólo los grupos amino que se encuentren deprotonados en el pH que se encuentre el medio podrán formar aductos. El pKa de la lisina es de 10,7, por lo que a pH 7,4 sólo el 0,05% de las lisinas se encontrarán deprotonadas en una proteína desplegada. Sin embargo, en proteínas plegadas, el valor de pKa de la lisina puede alterarse según la polaridad de su microentorno, por lo que las lisinas más expuestas mantendrán su valor de pKa, mientras que las lisinas que se encuentren hacia el interior de la proteína pueden disminuir el valor de su pKa incluso a 6 (Isom et al., 2011). Por lo tanto, las lisinas no expuestas a pH 7,4 se encontrarían aproximadamente en un 99% deprotonadas y serían capaces de formar aductos. Sin embargo, si las proteínas que contienen este tipo de lisinas se encuentran en organelos o vesículas con un pH más bajo que 6, disminuiría su porcentaje de deprotonación y conjuntamente su capacidad de formar aductos. En este estudio, se encontró que una proteína de 23 kDa se vería favorecida en la formación de aductos *in vivo* (figura 5.7., 5.8. y 5.11.), y que una proteína de aproximadamente 32 kDa se vería favorecida en la formación de aductos *in vitro* (figura 5.1. y 5.2.), en comparación con el resto de las proteínas cerebrales. Esta diferencia podría explicarse porque estas proteínas tendrían más lisinas deprotonadas *in vivo* o *in vitro*, según corresponde. La proteína de 23 kDa probablemente tenga una o más de sus lisinas deprotonadas *in vivo* y por esto puede formar aductos con más facilidad. En cambio, la proteína de 32 kDa probablemente tenga una o más lisinas protonadas *in vivo* y por esto no puede formar aductos (por ejemplo, si se encuentra en un organelo o vesícula con pH más bajo que el pKa de la lisina), pero al homogeneizar el tejido a pH 7,4 éstas se deprotonarían, y podrían formar el aducto *in vitro*.

Un estudio realizado por Lin et al., (1988) determinó que en el hígado de ratas expuestas a un consumo crónico de etanol de 2 semanas ó más, existe formación de aductos de proteína-acetaldehído estables por una proteína de 37 kDa (sin la utilización de un agente reductor externo). Luego, Zhu et al., (1996) identificó esta proteína como la  $\Delta^4$ -3-ketosteroide-5 $\beta$ -reductasa, proteína que pertenece a la familia de las aldo-keto reductasas. Probablemente, esto explicaría que esta proteína tenga una mayor afinidad con el acetaldehído, y que por esto el aducto formado con esta molécula tenga una mayor estabilidad. Este también podría ser el caso de la proteína de 23 kDa que se encontró en este estudio, por lo que esta posible mayor afinidad por el acetaldehído se podría sumar al posible estado deprotonado de sus lisinas *in vivo*. Por otra

parte, sería importante estudiar la identidad de la proteína, debido a que probablemente esta proteína pierda funcionalidad en sujetos que consuman alcohol crónicamente, y podría tener relevancia en los efectos neurotóxicos que se generan en el alcoholismo.

## **6.2. Detección del acetaldehído formado *in vivo* en el cerebro de rata por una dosis de etanol 1 ó 2 g/kg i.p.**

En este estudio se detectó indirectamente la generación *in vivo* de acetaldehído en el cerebro de rata luego de una dosis aguda de etanol 1 ó 2 g/kg i.p.. El acetaldehído detectado en el cerebro total de rata probablemente sea la sumatoria del acetaldehído generado localmente en las diferentes zonas cerebrales. Esto, porque aunque el acetaldehído es una molécula apolar que puede difundir por los tejidos, probablemente los niveles de acetaldehído generados en cada zona cerebral no se vean afectados por los niveles de acetaldehído generados en otras zonas cerebrales aledañas. Una evidencia indirecta de esto, es que al microinyectar en el VTA de ratas bebedoras de alcohol (UChB) un lentivirus codificante para un sh-RNA anticatalasa, estas ratas disminuyeron significativamente su consumo de etanol en comparación con ratas control, lo que se atribuye a la disminución en los niveles de acetaldehído que se generan normalmente en esa zona cerebral (Karahanian et al., 2011). Si los niveles de acetaldehído de una zona cerebral se vieran afectados por los niveles de las zonas aledañas, probablemente las ratas del estudio de Karahanian et al., (2011) no habrían dejado de beber, ya que el VTA se encuentra muy cercano a zonas con altos niveles de catalasa, como el núcleo rojo magnocelular y parvocelular (Moreno et al., 1995; Paxinos y Watson, 1986). Por lo tanto, los niveles de acetaldehído que se generan en una zona cerebral específica estarían compartimentalizados, y dependerían principalmente de su capacidad metabólica determinada por sus niveles de catalasa y por sus niveles de ALDH2 mitocondrial. Esta compartimentalización sería explicada principalmente por la alta tasa de degradación del acetaldehído, la que escasamente permitiría que esta molécula pudiera salir de las neuronas que componen una zona cerebral específica.

En el núcleo accumbens, los niveles de catalasa se encuentran dentro de los más bajos a nivel cerebral (Moreno et al., 1995), por lo que se esperaba que en esta zona cerebral fuera más difícil lograr la detección del acetaldehído luego de una dosis de etanol. En este estudio, se demostró la

formación *in vivo* de acetaldehído en el núcleo accumbens producto de la metabolización del etanol (figura 5.7), lo que da cuenta de la sensibilidad del método de detección utilizado. Como no se han desarrollado estudios en que se haya demostrado que ratas se autoadministran acetaldehído directamente en el núcleo accumbens, no se conoce si efectivamente la generación de acetaldehído en esta zona cerebral podría tener un efecto reforzante. Por esta razón, en este estudio no se determinaron además los niveles de acetaldehído que se encuentran en el núcleo accumbens luego de una dosis reforzante de etanol.

En el VTA de ratas, no se detectó generación de acetaldehído *in vivo* luego de una dosis reforzante de etanol, a diferencia del caso del cerebro total y del núcleo accumbens. Esto puede explicarse por el efecto conjunto de dos variables. La primera, es que los niveles de catalasa en el VTA se encuentran dentro de los más bajos a nivel cerebral, lo que predice que los niveles de acetaldehído que se generen luego de una dosis de etanol también se encuentren dentro de los más bajos. La segunda, es que el VTA es una zona cerebral que contiene aproximadamente un 65% de neuronas dopaminérgicas (Zessen et al., 2012), y la dopamina puede condensar con el acetaldehído formando salsolinol (Yamanaka et al., 1970), reacción que puede competir con la formación de aductos estables, lo que dificultaría la detección del acetaldehído (ver sección 6.4).

### **6.3. Estimación de niveles de acetaldehído que se encuentran *in vivo* en el cerebro de ratas, luego de una dosis de etanol 1 g/kg i.p.**

En este trabajo se elaboró una técnica que no sólo permite la detección de la formación *in vivo* de acetaldehído en el cerebro de ratas, sino que también permite la estimación de los niveles de acetaldehído en el cerebro total de rata luego de una dosis aguda de etanol. Esto, porque se demostró que la formación de aductos se relaciona directamente con la concentración de acetaldehído agregada a un homogeneizado de cerebro (figuras 5.8, 5.9 y 5.10), lo que es indicativo de que la detección y cuantificación de aductos puede ser utilizada como medida indirecta de la concentración de acetaldehído presente en un medio. Cabe destacar que la técnica realizada en este estudio permite detectar concentraciones de acetaldehído de incluso 5  $\mu\text{M}$  (figura 5.10).

La concentración de acetaldehído promedio que se encontró en el cerebro total de ratas tratadas con una dosis de etanol 1 g/kg i.p. (altamente reforzante) fue de  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5) (figura 5.11). Sin embargo, no se detectó aductos de proteína-acetaldehído en el VTA de animales tratados con etanol 1 g/kg i.p., por lo que no fue posible estimar la concentración de acetaldehído alcanzada en esta zona cerebral altamente dopaminérgica (figura 5.12).

Hasta ahora, el único estudio *in vivo* que había logrado estimar a nivel cerebral los niveles de acetaldehído generados luego de una dosis de etanol, tuvo que ocupar ratas pretratadas con un inhibidor farmacológico de la ALDH2 mitocondrial (cianamida) para poder detectar el acetaldehído, utilizando sondas de microdiálisis puestas en el estriado de los animales y acopladas a un cromatógrafo de gases head-space (Jamal et al., 2003). Sin el pretratamiento con este inhibidor, no se logró detectar acetaldehído. Sin embargo, se encontró que en ratas pretratadas con cianamida 100 mg/kg, una dosis de etanol de 1 g/kg i.p. generó una concentración de acetaldehído de 687  $\mu\text{M}$  en la sangre, y de 192  $\mu\text{M}$  en el cerebro de los animales. Cuando ratas no son pretratadas con cianamida, una dosis de etanol de 1 g/kg i.p. genera una concentración de acetaldehído en sangre de aproximadamente 15  $\mu\text{M}$  en la sangre (Quintanilla et al., 2007), por lo que analizando estos estudios se esperaba que, proporcionalmente, la concentración de acetaldehído a nivel del cerebro total fuera de aproximadamente 4,2  $\mu\text{M}$ , resultado que concuerda con lo encontrado en el presente estudio.

#### **6.4. Competencia entre la formación de aductos y la formación de salsolinol como explicación de la ausencia de aductos en el VTA de ratas tratadas con etanol reforzante**

En este estudio, se demostró que la formación de salsolinol es más rápida que la formación de aductos estables en homogeneizados de cerebro incubados con acetaldehído y  $\text{NaCNBH}_3$  en presencia de dopamina entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  M (figura 5.13), concentraciones que pueden encontrarse en las neuronas dopaminérgicas del VTA (Feinendegen et al., 2003). Específicamente, no se encontró formación de aductos en presencia de dopamina  $10^{-2}$  M, y la formación de aductos disminuyó en un 28% en presencia de dopamina  $10^{-4}$  M. Por lo tanto, es muy probable que el acetaldehído generado en esta zona cerebral forme salsolinol dentro de las neuronas

dopaminérgicas, y no en el espacio sináptico. Este resultado toma gran importancia en el contexto de detección de acetaldehído en el VTA, ya que además de que la detección de esta molécula es difícil por su rápida inactivación a acetato, en esta zona cerebral será aún más difícil la detección del acetaldehído porque éste condensaría con la dopamina antes de poder detectarlo (figura 5.12 y 5.13.). Una explicación para esto, es que la reacción entre el acetaldehído y la dopamina es bimolecular, y por lo tanto puede ocurrir más rápido que la reacción trimolecular que ocurre entre el acetaldehído, las proteínas y el  $\text{NaCNBH}_3$ . Además, la estabilidad de las bases de Schiff formadas entre el acetaldehído y los grupos amino de las proteínas podría ser menor que la estabilidad de la base de Schiff formada entre la dopamina y el acetaldehído, y esto también favorecería la formación de salsolinol. Estos factores dan cuenta de la complejidad de la determinación de los niveles de acetaldehído en el VTA luego de una dosis aguda de etanol. Por todo lo anterior, será muy difícil lograr la detección de acetaldehído en el VTA utilizando cualquier técnica de detección. Una alternativa propuesta, es eliminar la dopamina del VTA utilizando reserpina y AMPT (Yuan et al., 2002) y de esta forma probablemente se facilite la detección del acetaldehído. La reserpina actúa bloqueando el transportador vesicular de monoaminas, y el AMPT disminuye la dopamina inhibiendo a la tirosina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de la dopamina.



## 7. CONCLUSIONES

- La detección de aductos de proteína-acetaldehído puede ser utilizada como medida indirecta de la generación o presencia de acetaldehído en tejido cerebral.
- Se detectó la generación *in vivo* de acetaldehído en el cerebro de ratas tratadas con una dosis reforzante de etanol (1 ó 2 g/kg i.p.).
- Se estimó que la concentración de acetaldehído que se alcanza en el cerebro total de ratas tratadas con una dosis altamente reforzante de etanol (1 g/kg i.p.) es de  $6,42 \pm 2,90 \mu\text{M}$  (n=5).
- En el VTA de ratas tratadas con una dosis de etanol de 1 ó 2 g/kg i.p., no se detectó generación *in vivo* de acetaldehído, pues no se detectó presencia de aductos de proteína-acetaldehído.
- En tejidos que contienen dopamina, el acetaldehído condensa con la dopamina más rápido que la reacción de formación de aductos de proteína-acetaldehído. Como el VTA tiene aproximadamente un 70% de neuronas dopaminérgicas, posiblemente esto explicaría la ausencia de aductos en ratas tratadas con una dosis reforzante de etanol.

## 8. REFERENCIAS

Amit Z., Brown Z.W., Rockman G.E. (1977) **Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration.** *Drug Alcohol Depend* 2:495–500.

Aragon C., Amit Z. (1992) **The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: Evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action.** *Neuropharmacol* 31:709-712.

Aragon C., Rogan F., Amit Z. (1992) **Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system.** *Biochem Pharm.* 44:93-98.

Bradford M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 72:248-254.

Brown Z.W., Amit Z., Rockman G.E. (1979) **Intraventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive laboratory rats.** *Psychopharmacol.* 64:271–276.

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

Bustamante D., Quintanilla M.E., Tampier L., Gonzalez-Lira V., Israel Y., Herrera-Marschitz M. (2008) **Ethanol induces stronger dopamine release in nucleus accumbens (shell) of alcohol-preferring (bibulous) than in alcohol-avoiding (abstainer) rats.** *Eur J Pharmacol.* 591:153-158.

Carboni E., Imperato A., Perezani L., Di Chiara G. (1989) **Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats.** *Neuroscience.* 28:653–661.

Cassarett & Doull's (2008) **Toxicology. The basic science of poisons.** Seventh edition. 196-199.

Cohen G., Sinet P., Heikkila R. (1980) **Ethanol oxidation by rat brain in vivo.** *Alcohol Clin Exp Res.* 4:366-370.

Coldwell B.B., Solomonraj G., Trenholm H.L., Wiberg G. S. (1971) **The gas chromatographic estimation of ethanol, acetaldehyde, and acetone in ethanol metabolism studies** *Clin Toxicol.* 4:99-113.

CONACE (2003) **Informe sobre uso, abuso y dependencia al alcohol.** *Quinto estudio nacional de drogas en población general de Chile.*

Correa M., Salamone J., Segovia K., Pardo M., Longoni R., Spina L., Peana A., Vinci S., Acquas E. (2012) **Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent.** *Neurosci Biobehav Rev.* 36:404-430.

Craig C. Stitzel E. (2004) **Modern pharmacology with clinical applications.** 6<sup>th</sup> edition. 234.

Dancygier H. (2010) **Clinical hepatology: principles and practice of hepatobiliary disease.** 2:1114-1119.

Di Chiara G. (2002) **Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction.** *Behav Brain Res.* 137:75–114.

Di Chiara G., Imperato A. (1988) **Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85:5274–5278.

Donohue T.M., Tuma D.J., Sorrell M.F. (1983, a) **Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [<sup>14</sup>C] acetaldehyde to serum albumin.** *Archs Biochem Biophys.* 234:377-381.

Donohue T. M., Tuma D. J. and Sorrell M.F. (1983, b) **Binding of metabolically derived acetaldehyde to hepatic proteins in vivo.** *Lab Invest.* 49:226-229.

- Eriksson C.J.P., Sippel H., Forsander O. (1977) **The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography.** *Anal Biochem.* 80:116-124.
- Foddai M., Dosia G., Spiga S., Diana M., (2004) **Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA.** *Neuropsychopharmacol.* 29:530–536.
- Gill K., Menez J.F., Lucas D., Deitrich R.A. (1992) **Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue.** *Alcohol Clin Exp Res.* 16: 910-915.
- Goyal M., Basak A. (2010) **Human catalase: looking for complete identity.** *Protein Cell.* 1:888-897.
- Halliwell B. (2006) **Oxidative stress and neurogeneration: where are we now?.** *J Neurochem.* 97:1634-1658.
- He X.X., Nebert D.W., Vasiliou V., Zhu H., Shertzer H.G. (1997) **Genetic differences in alcohol drinking preference between inbred strains of mice.** *Pharmacogenetics.* 7:223–233.
- Hipólito L., Sánchez-Catalán M.J., Martí-Prats L., Granero L., Polache A. **Revisiting the controversial role of salsolinol in the neurobiological effects of ethanol: old and new vistas.** *Neurosci Biobehav Rev.* 36:362-378.
- ICD-10, **Internal Statistical Classification of Diseases and related health problems** (2010) Classification of mental and behavioural disorders. Diagnostic criteria for research.
- Imperato A., Di Chiara G. (1986) **Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol.** *J Pharmacol Exp Ther.* 239:219–228.
- Isom D., Castañeda C., Cannon B., García-Moreno B. (2011) **Large shifts in pK<sub>a</sub> values of lysine residues buried inside a protein.** *PNAS.* 108:5260-5265.
- Israel Y., Hurwitz E., Niemela O., Arnon R. (1986) **Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 83:7923-7927.

- Jamal M., Ameno K., Kumihashi M., Ameno S., Kubota T., Wang W., Ijiri I. (2003) **Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats.** *J Chrom B.* 798:155–158.
- Jentoft N., Dearborn D. (1979) **Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride.** *J Biol Chem.* 254:4359-4365.
- Jeong K., Soh Y., Jeng J., Felder M. (2000) **Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)-dependent production of a 37 kDa acetaldehyde-protein adduct in the rat liver.** *Arch Biochem Biophys.* 384:81-87.
- Karahanian E., Quintanilla M.E., Tampier L., Rivera-Meza M., Bustamante D., Gonzalez-Lira V., Morales P., Herrera-Marschitz M., Israel Y. (2011) **Ethanol as a prodrug: Brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects.** *Alcohol Clin Exp Res.* 35:605-612.
- Keilin E., Nicholls P. (1958) **Reactions of catalase with hydrogen peroxide and hydrogen donors.** *Biochem Biophys Acta.* 29:302.
- Klyosov A.A., Rashkovetsky L.G., Tahir M.K., Keung W.M. (1996) **Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism.** *Biochem.* 35:4445-4456.
- Koechling U.M., 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.
- Lee H.B, Blaufox D.(1985) **Blood Volume in the Rat.** *J Nuc Med.* 25:72-76.
- Lin R., Smith R., Lumeng L. (1988) **Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically.** *J Clin Invest.* 81:615-619.
- Lin R., Zhou F., Fillenwarth M., Lumeng L. (1993) **Zonal distribution of protein-acetaldehyde adducts in the liver of rats fed alcohol for long periods.** *Hepatology.* 18:864-869.
- Lumeng L., Lin R.C. (1991) **Formation of a 37 kilodalton liver protein-acetaldehyde adduct in vivo and in liver cell culture during chronic alcohol exposure** *Ann N Y Acad Sci.* 625:793-801.

Matsumoto H., Fukui Y. (2002) **Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology.** *Addict Biol.* 7:5-14.

Feinendegen L.E., Shreeve W.W., Eckelman W.C. Bahk Y.W., Wagner H.M.Jr. (2003) **Molecular nuclear medicine: the challenge of genomics and proteomics to clinical practice.** *Springer.* 7:166.

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

Nakamura K., Iwahashi K., Furukawa A., Ameno K., Kinoshita H., Ijiri I., Sekine Y., Suzuki K., Iwata Y., Minabe Y., Mori N. (2003) **Acetaldehyde adducts in the brain of alcoholics.** *Arch Toxicol.* 77:591-593.

OMS (Anderson P., Gual A., Colon J.) (2008) **Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas y el manejo de riesgos y problemas.** *Unidad de salud mental, abuso de sustancias y rehabilitación, THS/MH, OPS, Washington, D.C., EE.UU.*

Pardridge W. (2011) **Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid.** *Fluids Barriers CNS.* 8:7.

Patel V., Worrall S., Emery P., Preedy V. (2005) **Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration** *Alcohol Alcohol.* 40:485-493.

Paxinos G., Watson C. (1986) **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Second Edition.

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 M.E., Tampier L. (2003) **Acetaldehyde-reinforcing effects: Differences in low-alcohol-drinking (UChA) and high-alcohol-drinking (UChB) rats.** *Alcohol* 31:63-69.

Quintanilla M.E., Tampier L., Sapag A., Gertdzen Z., Israel Y. (2007) **Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversión to ethanol in the rat: a systems perspective.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293:E531-E537.

Quintanilla M.E., Tampier L., Karahanian E., Rivera-Meza M., Herrera-Marschitz M., Israel Y. (2012) **Reward and relapse: complete gene-induced dissociation in an animal model of alcohol dependence.** *Alcohol Clin Exp Res.* 36:517-522.

Redzic Z. (2011) **Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences.** *Fluids Barriers CNS.* 8:3.

Rintala J., Jaatinen P., Parkkila S., Sarviharju M., Kiianmaa K., Hervonen A., Niemelä O. (2000) **Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol.** *Alcohol Alcohol.* 35:458-63.

Rodd Z.A., Bell R.L., Zhang Y., Murphy J.M., Goldstein A., Zaffaroni A., Li T.K., McBride W.J. (2005) **Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol and acetaldehyde within the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats: involvement of dopamine and serotonin.** *Neuropsychopharmacology.* 30:330-338.

Rodd Z.A., Oster S.M., Ding Z.M., Toalston J.E., Deehan G., Bell R.L., Li T.K., McBride W.J. (2008) **The reinforcing properties of salsolinol in the ventral tegmental area: evidence for regional heterogeneity and the involvement of serotonin and dopamine.** *Alcohol Clin Exp Res.* 32:230-239.

Rodd-Henricks Z.A., Melendez R.I., Zaffaroni A., Goldstein A., McBride W.J., Lu T.K. (2002) **The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats.** *Pharmacol Biochem Behav.* 72:55-64.

Rodd-Henricks Z.A., Mckinzie D., Crile R., Murphy J., McBride W. (2000) **Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats.** *Psychopharmacol.* 149:217-224.

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

Self D.W., Nestler E.J. (1995) **Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction** *Annu Rev Neurosci.* 18:463-495.

- Smith B.R., Amit Z., Splawinsky J., (1984) **Conditioned place preference induced by intra-ventricular infusions of acetaldehyde.** *Alcohol.* 1:193–195.
- Song B.J. (1996) **Ethanol-inducible cytochrome P45 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update.** *Alcohol Clin Exp Res.* 20:s8,138A-146A.
- Speisky H., Macdonald A., Giles G., Orrego H., Israel Y. (1985) **Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration** *Biochem. J.* 225:565-572.
- Tampier L., Quintanilla M.E., Mardones J. (1995) **Effects of aminotriazole on ethanol, water and food intake and on brain catalase in UChA and UChB rats.** *Alcohol.* 12:341-344.
- Tuma D.J., Donohue V.A., Medina V.A., Sorrell M.F. (1984) **Enhancement of acetaldehyde-protein adduct formation by ascorbate.** *Archs Biochem Biophys.* 234:377-381.
- Upadhy S.C, Ravindranath V. (2002) **Detection and localization of protein-acetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment.** *Alcohol Clin Exp Res.* 26:856-63.
- Wallgren H., Barry H. III. (1970) **Actions of alcohol.** Amsterdam, Elsevier Publishing Company, Volumen I.
- Xu D.S., Jennett J.B., Smith S.L., Sorrell M.F., Tuma D.J. (1989) **Covalent interactions of acetaldehyde with the actin/microtilament system.** *Alcohol Alcohol* 24:281-289.
- Yamanaka Y., Walsh M.J., Davis V.E. (1970) **Salsolinol, an alkaloid derivative of dopamine formed in vitro during alcohol metabolism.** *Nature.* 227:1143-1144.
- Yuan J., Cord B.J., McCann U.D., Callahan B.T., Ricaurte G.A. (2002) **Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity.** *J Neurochem.* 80:960-969.
- Zessens R., Phillips J., Budygin E., Stuber G. (2012) **Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption.** *Neuron.* 73:1184-1194.



Zhu Y., Fillenwarth M.J., Crabb D., Lumeng L., Lin R.C. (1996) **Identification of the 37-kd rat liver protein that forms an acetaldehyde adduct in vivo as delta 4-3-ketosteoid 5 beta-reductase** *Hepatology*. 23:115-122.

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

Zimatkin S.M., Deitrich R.A. (1997) **Ethanol metabolism in the brain.** *Addict Biol*. 2:387-399.

Zimatkin S.M., Pronko S.P., Vasiliou V., Gonzalez F.J., Deitrich R.A. (2006) **Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain.** *Alcohol Clin Exp Res* 30:1500-5.