

TESIS DOCTORAL

EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL:
ANÁLISIS DEL ROL DE SUS PROPIEDADES
QUIMIOSENSORIALES E
INCONDICIONALES EN EL APRENDIZAJE
PRE Y POSTNATAL EN LA RATA

ASIER ANGULO ALCALDE

Directoras:

Dra. M^aGabriela Chotro

Dra. Mirari Gaztañaga Echeverría

Departamento de Procesos Psicológicos Básicos y su
Desarrollo

Facultad de Psicología

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko
Unibertsitatea

Noviembre 2021

*A mis padres, mi hermana, y mi abuela Loli,
por hacerme ir siempre un paso más allá.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría nombrar y agradecer a mis padres, Ricardo y Cristina, su apoyo durante todos los años de mi formación, sin el cual no hubiera podido realizar mis estudios. Tanto ellos, como mi hermana Idoia, han sido testigos de los altibajos propios de un doctorando durante la tesis. Por ello, les agradezco de corazón su paciencia y su apoyo incondicional.

Me gustaría agradecer a mis directoras, Gabriela Chotro y Mirari Gaztañaga, todo el trabajo y apoyo que han realizado y demostrado hacia mí, además de las grandes personas que son. Gabriela fue quien me motivó para realizar una tesis y durante estos años siempre me ha animado a ir más allá. Le estaré eternamente agradecido por haber confiado en mí para realizar un trabajo de investigación. De igual forma, siempre voy a agradecer que, siendo una gran profesora y una gran investigadora, me haya valorado y tenido en cuenta a pesar de no ser un alumno de expediente imaculado. Si hoy estoy escribiendo estos agradecimientos, tras toda una tesis, es por ti Gabriela, muchas gracias.

A Mirari quiero agradecerle todo. Junto a ella aprendí prácticamente todo lo que sé del laboratorio y de los animales que empleamos. En muchísimas ocasiones era ella a quien acudía en busca de consejo profesional, pero también como una amiga que comprendía mis miedos y ansiedades en el laboratorio. Como Gabriela, siempre me ha tratado como a un igual y lo agradezco

muchísimo. Gracias por todo lo que me has enseñado, y también por todos los consejos sobre la universidad y la vida en general, y especialmente por la paciencia que has tenido.

Este trabajo ha estado respaldado por la inestimable ayuda de los miembros del departamento, a los que estoy enormemente agradecido por permitirme formar parte de su grupo. Para mi fue un orgullo entrar al programa de doctorado y poder estar junto a profesores a los que admiraba y respetaba desde el grado y el master. Haber podido conocerlos y aprender de ellos ha sido todo un honor y una gran oportunidad. Me gustaría agradecer especialmente a los miembros del pasillo su simpatía diaria y su disposición para colaborar y ayudar a los demás, no se puede pedir mejores compañeros. Quiero agradecer a Sindi Alonso su disposición continua para ayudar y colaborar, así como las conversaciones que eventualmente teníamos y que me animaban a seguir adelante. Para mi fue increíble formar parte del grupo de investigación de quien me enseñó los primeros conceptos de aprendizaje, siempre la recordaré entre los/las mejores docentes que he tenido en mi vida. También me gustaría mencionar a Gabriel Rodriguez, quien además de ser un profesor de primer nivel, siempre me ha transmitido calma y paciencia para continuar en los momentos más duros de mi tesis. De igual modo me gustaría nombrar a Fernando, Unai, Paula y Manuel, compañeros con los cuales he podido conversar, trabajar y acudir a congresos y encuentros de divulgación científica. Las comidas en la cafetería, compartir el despacho, trabajar juntos en el laboratorio o los congresos me traen los mejores recuerdos de estos años a vuestro lado. A Carlos, técnico en el animalario, le

doy las gracias por el gran trabajo que realiza con los animales y por su simpatía; tanto las conversaciones que manteníamos sobre cualquier cosa, como su presencia en el laboratorio, calmaban la ansiedad que muchas veces sufría trabajando con los animales.

Quiero agradecer a mi novia Myriam todo el apoyo que me ha dado. La admiración que siempre ha mostrado por lo que hago me ha servido de motivación extra en muchas ocasiones. Me ha ayudado a ser consciente de dónde me encuentro y mantener los pies en la tierra. De igual modo, su forma de ser y su apoyo me han ayudado a superar los peores momentos anímicos en la tesis y también a no perder los objetivos marcados de vista, y a seguir siempre adelante. También quiero nombrar a sus padres, Richard y Blanca por toda la ayuda que me han brindado desde el primer momento en que nos conocimos, sin pedir nunca nada a cambio.

A la gente de Argentina, quiero agradecerles la amabilidad con la que me aceptaron en su laboratorio y todo lo que me enseñaron de la vida allá. Me sentí uno más y la experiencia con ellos fue realmente enriquecedora. Quiero agradecer a Juan Carlos Molina que me dejara participar en sus experimentos, así como sus valiosos consejos sobre mi trabajo, y poder haber sido testigo de su gran habilidad para la docencia.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a todos/as mis amigos/as, tanto de Vitoria como de otros lugares, los momentos que hemos pasado juntos estos años. Especialmente quiero agradecer a Urkizu y Kristian, amigos de toda la vida, su

amistad, por la ayuda que me han dado para desconectar tantas veces; a Cruz, por los momentos musicales en los que no se pensaba ni hablaba de otra cosa y a Jose los paseos por el monte y llenarme la cabeza de conocimientos sobre la naturaleza. A todos/as aquellos/as que me dejo sin nombrar, igualmente gracias por todo, esta tesis también es vuestra.

ÍNDICE

RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
1. CAPACIDAD FETAL DE PERCEPCIÓN Y APRENDIZAJE	3
1.1 Características generales del desarrollo fetal	3
1.2 Desarrollo sensorial	5
1.3 Capacidad de aprendizaje prenatal	9
1.3.1 Evidencias de aprendizaje no-asociativo	9
1.3.2 Evidencias de aprendizaje asociativo prenatal	14
2. EL ALCOHOL	18
2.1 Absorción, distribución y metabolismo en adultos	19
2.2 Alcohol y reproducción	24
2.3 Metabolismo del alcohol en el feto	26
3. EFECTOS DEL ALCOHOL EN LA GESTACIÓN	30
3.1 Efectos teratogénicos del alcohol en la gestación	31
3.2 Efectos de la exposición prenatal al alcohol sobre la conducta ante el alcohol	34
3.2.1 Evidencias clínicas	35
3.2.2 Evidencias de estudios con animales	43
4. POSIBLES MECANISMOS DE LOS EFECTOS CONDUCTUALES DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL	46
4.1 Mecanismos indirectos	46
4.2. Mecanismos de aprendizaje prenatal	53
4.3. El sistema opioide media los efectos conductuales del alcohol prenatal	54
5. EL PAPEL DEL ACETALDEHÍDO EN LOS EFECTOS DEL ALCOHOL	60
5.1. Aspectos generales del acetaldehído	60
5.2. Efectos ansiolíticos del acetaldehído	61
5.3. Efectos psicomotores del acetaldehído	62
5.4. Efectos reforzantes del acetaldehído	63
5.5. El acetaldehído en la exposición prenatal al alcohol	67
5.5.1. El rol del acetaldehído en los efectos del alcohol en el desarrollo cerebral fetal	70

5.5.2. Conexión entre los efectos conductuales del alcohol y acetaldehído en el feto	71
5.5.3. Efectos reforzantes del alcohol y el acetaldehído en el feto y en el neonato	72
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	77
METODOLOGÍA GENERAL	83
<i>SUJETOS</i>	85
<i>PROCEDIMIENTOS</i>	86
Tratamientos prenatales	86
Procedimientos y pruebas postnatales	88
<i>ANÁLISIS DE DATOS</i>	98
EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	99
EXPERIMENTO 1: APRENDIZAJE PRENATAL SOBRE LAS PROPIEDADES QUIMIOSENSORIALES DEL ALCOHOL	101
EXPERIMENTO 2: APRENDIZAJE PRENATAL POR LA ASOCIACIÓN ENTRE UN SABOR NEUTRO Y LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL ALCOHOL	118
EXPERIMENTO 3: MEDICIÓN DE ACETALDEHÍDO EN TEJIDO CEREBRAL MATERNO Y FETAL	135
EXPERIMENTO 4: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A UN ESTÍMULO QUIMIOSENSORIAL SOBRE SU CONDICIONAMIENTO EN LA INFANCIA	146
EXPERIMENTO 5: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL SOBRE SU CAPACIDAD PARA ACTUAR COMO ESTÍMULO INCONDICIONADO EN LA INFANCIA	156
DISCUSIÓN GENERAL	171
CONCLUSIONES	183
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	187

RESUMEN

Los fetos de rata son capaces de percibir olores y sabores derivados de la dieta materna, aprender sobre ellos y retener esta memoria hasta la vida postnatal, expresando cambios en la respuesta ante dichos estímulos. Cuando la madre gestante ingiere alcohol, éste llega al feto, el cual es expuesto tanto a sus propiedades quimiosensoriales (olor/sabor), como a sus propiedades farmacológicas. Los fetos pueden asociar ambas características del alcohol y aprender una preferencia condicionada por su sabor y olor; lo que genera una mayor atracción por su olor en la etapa neonatal, y en la infancia y adolescencia un mayor consumo de alcohol y un aumento de la palatabilidad. Se ha demostrado que las propiedades incondicionales del alcohol son en realidad mediadas por su primer metabolito, el acetaldehído. El objetivo general de esta tesis es el de analizar en profundidad las consecuencias de la experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales y farmacológicas (incondicionales) del alcohol, tanto juntas como por separado, sobre la respuesta postnatal al sabor y olor etílicos, a sus propiedades incondicionales, o a otros estímulos quimiosensoriales experimentados de forma conjunta con esta droga. Los resultados mostraron que los neonatos de rata pueden expresar una atracción por el olor del alcohol cuando, en ausencia de reforzamiento apetitivo, la exposición prenatal a las propiedades quimiosensoriales del alcohol ha sido suficientemente intensa. Se observó que la exposición prenatal a un sabor neutro, como la vainilla, junto

con el alcohol induce, además de una mayor atracción neonatal por su olor, un mayor consumo en la infancia; lo que no se observó en ausencia de acetaldehído. Además, se encontró que la exposición prenatal a la vainilla facilita el condicionamiento postnatal de este sabor, tanto si se expone sola como junto con el alcohol y sus efectos incondicionados. Finalmente, se demostró que la exposición prenatal al alcohol dificulta el condicionamiento aversivo postnatal cuando el alcohol actúa como estímulo incondicionado. En conclusión, se ha visto que la administración de alcohol durante los últimos días de la gestación genera una experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales y los efectos incondicionales del alcohol, la cual modifica la respuesta neonatal e infantil ante el olor y sabor del alcohol, aunque también ante otros estímulos experimentados de forma conjunta con el alcohol. Esta experiencia prenatal también puede facilitar el aprendizaje condicionado postnatal sobre el sabor del alcohol y al mismo tiempo atenuar las consecuencias incondicionales aversivas de esta droga. Es decir, la exposición prenatal al alcohol, por un lado, reduce el potencial aversivo de la intoxicación etílica y por otra parte genera una preferencia condicionada prenatal por el alcohol que incrementa su consumo. Estos dos efectos confirman que el consumo materno de alcohol en la gestación incrementa considerablemente las posibilidades de que los sujetos expuestos desarrollen un consumo problemático de alcohol en etapas posteriores de la ontogenia.

INTRODUCCIÓN

1. CAPACIDAD FETAL DE PERCEPCIÓN Y APRENDIZAJE

Está bien demostrado que antes del nacimiento los mamíferos son capaces de percibir estímulos y aprender sobre ellos. A continuación, se detallan evidencias sobre el desarrollo de estas capacidades prenatales, que resultan imprescindibles para comprender el trabajo llevado a cabo en esta tesis.

1.1 Características generales del desarrollo fetal

El desarrollo prenatal de los mamíferos consta de dos fases diferenciadas. La primera de ellas es la fase embrionaria y la segunda la fetal. La fase embrionaria comienza con la fecundación; tras la división del cigoto, el embrión se adhiere a las paredes del útero y se comienza a formar la placenta y el cordón umbilical. En esta fase ocurre la generación y el desarrollo de todos los órganos del embrión, con las particularidades de su especie (Smok, Roa, y Rojas, 2014). Tras esto comienza la etapa fetal que durará hasta el nacimiento. Durante esta fase no se generarán órganos nuevos, únicamente madurarán los órganos ya desarrollados.

En los seres humanos, el proceso completo de la gestación tiene una duración aproximada de 38 semanas, desde el momento de la fertilización. Como en el resto de mamíferos las células comienzan dividiéndose, y al séptimo día el embrión se implanta en el útero. Esta fase embrionaria tiene una duración de ocho semanas. A partir de la semana 9 comienza la fase fetal hasta el momento del nacimiento. En la

rata, que es el modelo animal usado en este trabajo, la gestación dura 22,5 días. La división celular previa a la implantación dura unos 2-3 días y la fase embrionaria aproximadamente hasta el día de gestación (DG) 15. A partir de dicho momento y hasta el nacimiento es considerado un feto (Smotherman, Robinson, y Robertson, 1988).

En los mamíferos, los embriones y los fetos se desarrollan en un medio acuoso, el líquido amniótico, contenido dentro de la membrana amniótica o amnios, y ésta a su vez está rodeada por la membrana coriónica (o corion), que es parte de la placenta. La placenta es el órgano que conecta al feto con su madre a través del cordón umbilical y tiene, entre otras funciones, transportar nutrientes, eliminar residuos y luchar contra agentes infecciosos. El cordón umbilical consta de una vena y dos arterias a través de las cuales circula la sangre con los nutrientes para el feto y, del mismo modo, enviar residuos para su eliminación al sistema materno. El líquido amniótico es generado desde el plasma materno, y contiene elementos necesarios para el desarrollo prenatal, como aminoácidos, oxígeno o glucosa (Liley, 1972). Muchas sustancias de la dieta materna atraviesan la placenta en función de factores tales como la dosis o concentración, sus propiedades químicas y estructurales y su afinidad con las características de la placenta (Robinson y Méndez-Gallardo, 2010). Estas sustancias pueden tener propiedades quimiosensoriales (olor y sabor) y/o poseer propiedades tóxicas o farmacológicas. La permeabilidad de la placenta va

sufriendo cambios a lo largo del desarrollo fetal, volviéndose más permeable hacia el final de la gestación, lo que facilita que ciertas sustancias potencialmente nocivas la puedan atravesar más fácilmente en esas etapas (Unadkat, Dahlin, y Vijay, 2005). Muchas de estas sustancias provenientes de la madre pueden llegar también al líquido amniótico en el que está inmerso el feto (Robinson y Méndez-Gallardo, 2010).

1.2 Desarrollo sensorial

Los mamíferos se pueden clasificar en altriciales o precociales, en función del grado de maduración sensorial y motora en el momento del nacimiento, además del grado de dependencia de los progenitores para conseguir cuidado y alimento (Hall y Oppenheim, 1987). Los seres humanos y la gran mayoría de los roedores, entre ellos la rata, son considerados mamíferos altriciales, ya que nacen con un alto grado de dependencia materna.

A pesar de las diferencias mencionadas, el desarrollo de los sentidos en mamíferos sigue la misma secuencia. En primer lugar, se desarrolla el sentido del tacto seguido de la propiocepción, luego la función vestibular, el olfato, el gusto y por último el oído y la visión. En la rata, los sentidos se desarrollan en el mismo orden, pero al tratarse de un mamífero altricial, los sentidos del oído y de la vista terminan por desarrollarse tras el nacimiento; es decir, la cría de rata es ciega y sorda hasta el día postnatal 14 (PD 14) (Pedersen y

Blass, 1982). El grado de inmadurez en el desarrollo de los mamíferos altriciales, junto con su sistema nervioso también inmaduro y la dependencia materna prolongada, conlleva grandes limitaciones perceptivas, y por lo tanto de aprendizaje para estos animales. A diferencia de la rata, el ser humano nace con todos sus sentidos funcionales, aunque entre ellos hay diferencias en el grado de maduración. Esta disposición sensorial constituye una gran posibilidad de obtención de información en etapas muy tempranas del neurodesarrollo (Hall y Oppenheim, 1987).

Centrándonos en el desarrollo de cada sentido, las primeras evidencias de que el tacto y la propiocepción son funcionales desde antes del nacimiento, se encontraron al comprobar la reacción fetal a estimulación en determinadas zonas como la perioral (Narayanan, Fox, y Hamburger, 1971). Otros autores han encontrado, tanto en humanos como en ratas, conductas motoras espontáneas que han sido identificadas como aquellas primeras activaciones motoras que, en el futuro, regularán la exploración propioceptiva del neonato (Robertson y Bacher, 1995; Robertson y Smotherman, 1990; Smotherman et al., 1988).

El sentido del olfato consta de tres subsistemas, cada uno con su propia función; bulbo olfatorio accesorio, complejo glomerular y el bulbo olfatorio principal. Los dos primeros subsistemas están completamente operativos antes del nacimiento, y el último termina por desarrollarse tras el nacimiento. El bulbo olfatorio accesorio permite al feto

detectar diferentes olores en el líquido amniótico mientras que el complejo glomerular interviene en la detección y reconocimiento de olores presentes en el ambiente neonatal relacionados con la madre y la lactancia (Mistretta y Bradley, 1986). En un estudio se encontró que crías de rata recién nacidas, mostraban atracción por el olor del líquido amniótico y que esa atracción facilitaba los primeros episodios de lactancia (Teicher y Blass, 1977). Del mismo modo observaron que si limpiaban los pezones de la madre, eliminando el rastro de la mencionada clave olfativa, los neonatos tenían problemas para encontrarlos e iniciar la lactancia (Teicher y Blass, 1976). Todas estas constituyen las primeras evidencias de la capacidad del feto y del neonato de percibir olores y responder ante ellos, además de mostrar la importancia de este sentido para guiar la primera conducta de lactancia y la búsqueda de protección y cuidado materno (Pedersen, Greer, y Shepherd, 1986).

El sentido del gusto también se ha observado que es funcional poco antes del nacimiento, aunque no acaba de madurar hasta etapas postnatales. Algunos autores han observado que los fetos responden ante ciertas estimulaciones gustativas, como por ejemplo a sabores dulces (Arnold, Robinson, Spear, y Smotherman, 1993; Mickley, Remmers-Roeber, Crouse, Walker, y Dengler, 2000). Aunque se ha encontrado que el porcentaje de papilas gustativas activas es muy reducido la primera semana postnatal, y que no están completamente operativas hasta la cuarta semana

(Coopersmith, Lee, y Leon, 1986; Mistretta y Bradley, 1986). Teniendo en cuenta esta información, resulta lógico pensar que en el feto habrá aún una menor activación de papilas que en el neonato. Sin embargo, se ha encontrado que la estimulación quimiosensorial en el feto podría actuar directamente sobre el nervio gustativo, lo que habilitaría la posibilidad de detectar sabores por esta otra vía (Mbiene y Farbman, 1993).

En cuanto a la audición, hay evidencia de que los fetos humanos en su tercer trimestre son capaces de percibir sonidos aplicados al abdomen materno (Moon y Fifer, 2000). Igualmente, trabajos realizados con animales demostraron que los fetos de los mamíferos están expuestos, dentro del útero, a una gran variedad de sonidos tanto de procedencia materna como externa. La disponibilidad de estimulación acústica y el desarrollo de la audición antes del nacimiento posibilitan el aprendizaje prenatal, que adquiere gran valor para los primeros momentos postnatales (Armitage, Baldwin, y Vince, 1980). Por ejemplo, en humanos, tras el nacimiento, se ha observado que los bebés reconocen la voz materna y además identifican sonidos experimentados prenatalmente (Graven y Browne, 2008; Hepper, Scott, y Shahidullah, 1993).

Por último, la vista en humanos comienza a desarrollarse en torno a la vigesimosexta semana de gestación y no finaliza hasta los seis meses tras el nacimiento (Moon y Fifer, 2000). En la rata, lo referido a estos dos últimos sentidos, tal como se había comentado, no se encuentran funcionales

totalmente hasta el día postnatal (DP) 12, cuando el canal auditivo se abre, y el DP 13, cuando se abre la fisura palpebral (Cornwell-Jones y Sobrian, 1977).

1.3 Capacidad de aprendizaje prenatal

Hasta no hace mucho tiempo, se consideraba que un sujeto comenzaba a aprender a partir del nacimiento, sin embargo, ya existen suficientes evidencias científicas demostrando que esto ya ocurre durante la etapa fetal (Alonso y Chotro, 2004). La bibliografía científica sobre el aprendizaje fetal muestra evidencias de aprendizaje simple, de carácter no-asociativo, y también hay muchas evidencias sobre la capacidad de los fetos para generar un aprendizaje más complejo, de tipo asociativo (Alonso y Chotro, 2004).

1.3.1 Evidencias de aprendizaje no-asociativo

Las habilidades de aprendizaje del feto comienzan con los procesos más básicos como la habituación, la sensibilización y la familiaridad. Se entiende por habituación al proceso de reducción de la respuesta de un organismo ante un estímulo por su presentación reiterada, mientras que la sensibilización es el aumento en la respuesta por la presentación repetida de un estímulo. En cuanto a la familiarización, se refiere al proceso por el que un estímulo novedoso pasa a ser familiar por la simple exposición al

mismo. En general, un estímulo familiar es preferido ante uno novedoso (neofobia) (Cornell, 1979).

Hay diferentes estudios en los que se recogen ejemplos de habituación en fetos (Groome et al., 1993; Van Heteren, Boekkooi, Schiphorst, Jongsma, y Nijhuis, 2001). Por ejemplo, en un estudio en el que se aplicaron estímulos auditivos sobre el abdomen de las madres embarazadas, se encontró que esta estimulación producía en los fetos una respuesta de orientación cardíaca (bradicardia seguida de taquicardia). Tras varios ensayos se encontró una disminución de dicha respuesta de orientación; pero solo a partir de la semana 35 de gestación (Morokuma et al., 2008). En otro trabajo, empleando estimulación vibroacústica aplicada en el abdomen materno, se observó que los neonatos se habitúan más rápidamente a este tipo de estimulación cuando han sido expuestos a la misma durante la etapa fetal. Esto demuestra que el aprendizaje prenatal puede facilitar este tipo de aprendizajes en la vida postnatal (Gonzalez-Gonzalez et al., 2006).

El proceso de sensibilización en fetos también ha sido observado por diferentes autores. Por ejemplo, en un estudio con ratas se observó que la intoxicación con una dosis moderada de alcohol inducía una disminución de la actividad motora general en los fetos. Esta depresión motora fue mayor en sujetos con exposición previa al alcohol (DG 17-19), lo que fue interpretado por los autores como una sensibilización de la respuesta motora al efecto depresor del alcohol (Chotro y Spear, 1997).

Con respecto a la familiaridad, como ya se ha comentado previamente, existen evidencias de neonatos mostrando preferencia por estímulos experimentados en la etapa fetal. Por ejemplo, en un estudio sobre las capacidades de los neonatos para discriminar las voces de sus madres midiendo las succiones que realizaban a un pezón artificial, comprobaron que ante la voz de su madre los bebés tienden a incrementar la frecuencia de succión, mientras que disminuye en presencia de una voz no-materna (DeCasper y Fifer, 1980). También hay varias evidencias de preferencia por estímulos familiares utilizando estimulación quimiosensorial (olores y/o sabores). Por ejemplo, en un estudio en el que mujeres gestantes consumieron zumo de zanahorias en sus últimas semanas del embarazo, se encontró que a los seis meses de edad sus hijos mostraron una reducción de las respuestas aversivas cuando les daban a probar por primera vez un puré con sabor a zanahoria, en comparación con bebés cuyas madres no habían consumido zanahoria durante el embarazo (Mennella, Jagnow, y Beauchamp, 2001). Un resultado similar fue obtenido en otro estudio en el que mujeres gestantes consumieron caramelos con sabor a anís al final de la gestación, y luego sus bebés recién nacidos mostraron una reducción en la respuesta aversiva ante este olor, en comparación con bebés cuyas madres no consumieron caramelos de anís (Schaal, Marlier, y Soussignan, 2000).

Al igual que en humanos, existen muchos estudios aportando evidencias sobre la preferencia por estímulos

quimiosensoriales experimentados en la etapa fetal. Por ejemplo, en un trabajo con perros en el que las hembras gestantes comían comida aromatizada con anís, observaron que sus cachorros preferían la comida aromatizada con ese aroma, en comparación con otros cachorros no expuestos (Wells y Hepper, 2006). Resultados similares fueron observados en un estudio con gatos en el que las madres fueron alimentadas con una dieta aromatizada con vainilla o con eucalipto durante el último periodo de la gestación y/o durante la lactancia. Encontraron que las preferencias de las crías estaban marcadas por la exposición prenatal o postnatal a estos aromas, en comparación con los grupos controles, pero observaron que el efecto era más robusto cuando habían sido expuestos en ambos periodos, prenatal y postnatal. Esto podría estar señalando que, a pesar de que la experiencia prenatal o postnatal aisladas poseen un gran potencial para generar aprendizajes no asociativos, ambas juntas generarían un mayor impacto sobre las preferencias alimenticias (P. G. Hepper et al., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, la experiencia prenatal con olores adquiere una gran importancia a la hora de guiar a los mamíferos en su primera lactancia. Durante el parto la rata parturienta lame cada feto para extraer las membranas y luego se lame el vientre, en ese proceso impregna con líquido amniótico toda su zona ventral, incluyendo los pezones. De este modo, siguiendo el rastro olfativo del líquido amniótico (olor familiar), los neonatos encuentran de forma autónoma el

pezón de la madre y pueden iniciar la primera lactancia. En relación con esto, en un experimento en el que se limpió el vientre materno eliminando claves olfativas, los neonatos tuvieron dificultades para encontrar el pezón. Además, cuando se inyectó citral (aroma de limón) en el líquido amniótico de fetos de rata a término, se observó que dos días después del nacimiento estas crías encontraban más fácilmente el pezón materno si este había sido impregnado con citral (Pedersen y Blass, 1982). Además, se ha encontrado que hay una sustancia con olor en común presente tanto en el líquido amniótico como en la saliva materna, aunque aún no se ha aislado dicha sustancia (Robinson y Méndez-Gallardo, 2010). Este tipo de trabajos demostraron la especificidad del efecto de exposición prenatal a un olor concreto y, por ende, la capacidad de los fetos para generar un aprendizaje por medio del proceso de familiarización con un estímulo quimiosensorial. Otro ejemplo interesante es un trabajo en el que se administró directamente al líquido amniótico de cada feto una pequeña cantidad de zumo de manzana durante el DG 20. Al DP 60 los sujetos expuestos a la manzana consumieron más cantidad de zumo de manzana que de agua, y bebieron más zumo de manzana que los sujetos sin exponer (Smotherman, 1982).

Además de los ejemplos ya citados, existe una gran variedad de estudios con diferentes especies de mamíferos en la que se encuentra consistentemente una preferencia y atracción postnatal por sabores y olores experimentados durante la gestación. Algunos de estos trabajos, por ejemplo,

se realizaron con conejos y bayas de enebro (Bilkó, Altbäcker, y Hudson, 1994); en corderos con orégano (Simitzis et al., 2008); en ratas con ajo (Hepper, 1988) y cineol o eucalipto (Abate, Pepino, Domínguez, Spear, y Molina, 2000). Asimismo, en varios estudios se ha encontrado que la exposición prenatal a estímulos quimiosensoriales no sólo guía al recién nacido en sus primeras conductas de lactancia, si no que puede modular y facilitar el establecimiento de conductas alimenticias en etapas posteriores (Abate, Spear, y Molina, 2001; Smotherman, 1982). Por ejemplo, en un estudio con cerdos se observó que la exposición prenatal a un aroma facilitó la aceptación de la comida sólida en el destete, cuando la comida estaba aromatizada con dicho aroma (Oostindjer, Bolhuis, Van Den Brand, Roura, y Kemp, 2010). También en ratas se ha observado que la exposición al final de la gestación a un olor particular, induce en la descendencia un aumento en el consumo de sustancias con ese olor en la adolescencia (Abate et al., 2001; Mennella et al., 2001; Schaal et al., 2000) y la adultez (Smotherman, 1982).

1.3.2 Evidencias de aprendizaje asociativo prenatal

Además de la capacidad de adquirir aprendizaje no asociativo, se ha demostrado que los fetos pueden adquirir aprendizajes de tipo asociativo. Es decir, un estímulo, a priori neutro o sin valor (estímulo condicionado, EC), que acontece junto a otro con unas consecuencias positivas o negativas para

el sujeto (estímulo incondicionado, EI), adquiere sus propiedades e induce una respuesta condicionada (RC) similar a la del EI. La mayoría de los trabajos que reflejan aprendizaje asociativo en fetos fueron realizados con animales, aunque también hay evidencias en humanos. Como ejemplo un trabajo en el que se empleaba como EC estimulación vibrotáctil y como EI un sonido fuerte que provocaba movimiento fetal. Tras varios ensayos de emparejamiento del EC con el EI, observaron que la respuesta de movimiento fetal era observada en presencia del EC; un resultado que confirmó la capacidad de los fetos de adquirir aprendizajes asociativos (Spelt, 1948).

Con ratas, en el primer estudio que demostró condicionamiento clásico, se indujo una aversión condicionada al sabor del zumo de manzana (EC) tras su emparejamiento con cloruro de litio (EI) al DG 20. Los sujetos fueron evaluados en la infancia, al DP 16, y mostraron una disminución significativa en el consumo de zumo de manzana en comparación con sujetos no condicionados, es decir, una aversión condicionada (Stickrod, Kimble, y Smotherman, 1982). En otro estudio, se encontró condicionamiento aversivo incluso en fetos de 17 días. Estos sujetos fueron aversivamente condicionados al mentol y dos días más tarde, al DG 19, los sujetos mostraron una supresión en la actividad general en presencia del EC, mostrando aversión ante la reexposición al olor del mentol. Estos mismos autores encontraron que este aprendizaje es específico del estímulo que ha sido

condicionado, es decir, que no se generaliza a otros estímulos quimiosensoriales (Smotherman y Robinson, 1985). En otro estudio se encontró que al DG 20 los fetos de rata eran capaces de asociar un pezón artificial con la administración oral de leche, reaccionando posteriormente con movimientos bucales solo ante la presentación del pezón artificial (Smotherman, Arnold, y Robinson, 1993). En otro estudio se observó una aversión condicionada al ajo en ratas de 6 semanas cuyas madres fueron administradas con extracto de ajo seguido de una inyección de LiCl (DG 18-19). Este resultado no se observó cuando la administración prenatal tuvo lugar días previos (DG 15-16) (Gruest, Richer, y Hars, 2004). Este resultado podría indicar que los fetos de rata antes del DG 16 no poseen la capacidad de percibir olores y/o de generar un aprendizaje a partir de ese tipo de estimulación.

Finalmente, además de la capacidad fetal de adquirir aversiones condicionadas, también hay evidencias de inhibición latente al DG 18. En este estudio se administró a la mitad de los fetos extracto de ajo directamente en el saco amniótico al DG 18, mientras que la otra mitad recibió solución salina. Al siguiente día, todos los fetos fueron expuestos al olor del ajo seguido de una inyección de LiCl. Al ser evaluados en el DG 21 los sujetos sin exposición al DG18 mostraron una fuerte aversión al olor del ajo, mientras que los sujetos preexpuestos mostraron una reducción de esta aversión. Esto se interpretó como una evidencia de inhibición latente (Mickley et al., 2013).

Todos estos estudios aportan evidencias sobre la capacidad de los fetos de aprender sobre los estímulos que perciben en su ambiente y sus consecuencias, y también aportan evidencias sobre la retención de este aprendizaje prenatal que se ha comprobado que se puede expresar después del nacimiento, a pesar del drástico cambio de contexto, y en muchos casos, tras un periodo de tiempo relativamente prolongado.

2. EL ALCOHOL

Entre los componentes de la dieta materna que alcanzan al feto, no todos resultan nutritivos o beneficiosos para el mismo, ya que hay agentes que pueden ejercer un efecto tóxico o dañino. Uno de esos agentes, y el objeto de interés para esta tesis, es el alcohol. El consumo de alcohol durante el embarazo es relativamente frecuente y, por ejemplo, en países europeos el 30-60% de las mujeres embarazadas consume alcohol durante la gestación, un dato realmente alarmante si se tiene en cuenta que no hay una dosis segura de alcohol para el feto (Moreno, 2017). Por el contrario, en países en los cuales el alcohol culturalmente tiene una apreciación negativa, el consumo es considerablemente inferior (Popova, Lange, Probst, Gmel, y Rehm, 2017). En un estudio llevado a cabo en España, se estableció que la prevalencia de consumo de alcohol durante el embarazo era del 27.2%. Esta tasa es menor que en otros países europeos y además, dentro de ese grupo de mujeres que beben durante el embarazo, parece ser que la tasa disminuye en función que avanza la gestación (23,1% y 17,1% para el segundo y tercer trimestres) (Blasco-Alonso et al., 2015).

El alcohol, o alcohol etílico o simplemente alcohol, es un compuesto químico orgánico con una molécula relativamente simple con dos átomos de carbono, un átomo de oxígeno y seis átomos de hidrógeno (CH₃-CH₂-OH). Se deriva por descomposición de carbohidratos vegetales, un proceso que

puede ser espontáneo pero que se acelera por la acción catalítica de las levaduras (*Saccharoyces cerevisiae*). No contiene ningún valor nutritivo para el organismo, proporciona sólo 7,2 kcal por gramo, y se consideran como calorías vacías (Lorenzo, Ladero, Leza, y Lizasoain, 1999). No es un producto normal del metabolismo humano, a excepción de la pequeña cantidad de alcohol producido por la fermentación de los carbohidratos por la flora bacteriana en el intestino, y normalmente llega a nuestros tejidos por la ingestión de bebidas alcohólicas. La ingestión de cantidades elevadas de alcohol interrumpe el equilibrio del cuerpo, ya que el organismo necesita activar recursos para procesarlo y eliminarlo (Lorenzo et al., 1999). Sus cualidades físicas hacen que el alcohol sea una sustancia muy dañina para el organismo: es muy soluble en agua, lo que le permite llegar a cada célula del organismo, y también es soluble en grasa (aunque diez veces menos que en agua), una razón por la cual cruza todas las barreras lipídicas de nuestro organismo.

2.1 Absorción, distribución y metabolismo en adultos

El alcohol cuando es ingerido, se absorbe desde todo el tracto digestivo. Pasa directamente a la sangre, tanto desde el estómago como del intestino, aunque la absorción más rápida se produce en el intestino. La absorción del alcohol está determinada principalmente por la concentración y por la dosis que haya sido administrada o ingerida. Cuando el alcohol

es ingerido en una concentración de entre un 15 y un 30% es cuando mayor absorción se produce de la droga. Por debajo de estos niveles el gradiente de absorción es menor y por encima de ellos también, ya que reduce el peristaltismo intestinal. La presencia de los alimentos sólidos en el estómago también retrasa la absorción de la droga.

Debido a la solubilidad del alcohol en agua y en lípidos, el alcohol se distribuye fácilmente a través de todas las membranas celulares. Dicha distribución se produce de forma rápida y equitativa en todos los tejidos del cuerpo y en proporción a la cantidad de agua contenida en dichos tejidos. El alcohol atraviesa sin dificultad la barrera hematoencefálica y también la placenta. Por la diferencia en proporción de agua con respecto al peso corporal es menor en mujeres (44-55%) que en hombres (55-65%), el volumen de distribución del alcohol será más bajo en las mujeres que en los hombres; es decir, la concentración de alcohol en sangre en las mujeres será más alta que en hombres con un consumo equivalente de alcohol (Abel y Dintcheff, 1984). Aunque existen amplias variaciones entre individuos, el pico de concentración de alcohol en sangre se alcanza aproximadamente entre los 30 y 60 minutos después de haber sido consumida la droga.

Después de la absorción y distribución, el alcohol comienza a ser eliminado por excreción y metabolización. La eliminación directa o excreción de la droga se realiza a través de la respiración, saliva, lágrimas, orina o heces. Pero alrededor del 90% de la droga se consume en el proceso metabólico que

tiene lugar fundamentalmente en el hígado. Este proceso consta de tres pasos enzimáticos: el primero es el de la conversión de alcohol en acetaldehído, el segundo de acetaldehído a acetato y, por último, el acetato es convertido en dióxido de carbono y agua. Para completar el primer paso hay tres sistemas enzimáticos diferentes: alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsómico oxidativo (MEOS) y el sistema de catalasa (Crabb y Liangpunsakul, 2007; Escarabajal, 2002). Sin embargo, no todos estos sistemas juegan el mismo papel en la metabolización, el primero de ellos es ADH, que convierte el 90% de alcohol en acetaldehído. Esta enzima está presente en el hígado en 17 formas diferentes o isoenzimas, y su activación depende de la cantidad y concentración de alcohol. La velocidad de metabolización depende de la cantidad de enzimas disponibles y es independiente de la concentración de alcohol, la oxidación de alcohol y los niveles de acetaldehído son constantes en la sangre. Como ejemplo, se cree que, en un bebedor esporádico sano, la tasa de metabolización del alcohol oscila entre 60 y 150 mg / kg / hora (Escarabajal, 2002; Zakhari, 2006). En el caso del MEOS, éste es responsable sólo del 3 al 10% del proceso metabólico total, y su actividad aumenta cuando la concentración de alcohol en la sangre es muy alta (Hipolito, Sanchez, Polache, y Granero, 2007). Además, este sistema también participa en el metabolismo de otras drogas, como los barbitúricos, siendo esta la razón por la cual algunos alcohólicos muestran resistencia a los efectos de

esta y otras drogas (Escarabajal, 2002; Zakhari, 2006). En referencia al sistema de catalasa, hay abundantes catalasas en el hígado que lo protegen del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la cantidad metabolizada por este sistema es irrelevante, y se ha demostrado que su inhibición no afecta la tasa de oxidación periférica del alcohol.

Además del proceso de metabolización que tiene lugar en el sistema periférico, se ha demostrado que el sistema nervioso central también tiene todas las enzimas necesarias para metabolizar el alcohol. Este hecho se encontró cuando los investigadores se dieron cuenta de que se podía encontrar acetaldehído en el cerebro después de la ingesta de alcohol. Dado que el acetaldehído no cruza la barrera hematoencefálica, al menos hasta que alcanza concentraciones muy altas en la periferia, los investigadores en las últimas décadas han estado buscando las vías alternativas que el sistema nervioso central utiliza para metabolizar el alcohol. A pesar de que las enzimas ADH y el sistema MEOS se han detectado en el cerebro, los datos más recientes muestran que las catalasas son las principales responsables de la conversión de alcohol en acetaldehído. Hay tres hechos importantes que llevaron a los investigadores a descubrir hace 30 años que el acetaldehído se forma directamente en el cerebro y no por la enzima hepática ADH. El primero fue que el alcohol cruza fácilmente la barrera hematoencefálica; el segundo, que el acetaldehído periférico atraviesa la barrera hematoencefálica con dificultad debido a

la presencia de ALDH, que convierte rápidamente el acetaldehído en acetato (Deitrich, 1987; Eriksson, Sippel, y Forsander, 1977; Zimatkin, 1991); y finalmente, el fracaso para encontrar ADH en el cerebro de la rata, mientras que sí se detecta acetaldehído después del consumo de alcohol (Amit, Brown, y Rockman, 1977). Todo esto obligó a considerar la posibilidad de que otros sistemas sean responsables de la metabolización del alcohol en acetaldehído, como el sistema de la enzima catalasa. Cohen y colegas (1980) fueron los primeros autores en sugerir que el acetaldehído podría formarse directamente dentro del cerebro por la acción de la enzima catalasa. Desde entonces, se han publicado muchos estudios con demostraciones in vivo e in vitro de la actividad catalasa en el cerebro (Aragon, Spivak, y Amit, 1989; Aragon, Rogan, y Amit, 1992; Zimatkin y Lindros, 1996; Zimatkin, Liopo, y Deitrich, 1998). También encontraron que el cerebro de rata neonatal usaba este sistema, ya que había una falta general de ADH en su cerebro, mientras que tenían una gran cantidad de catalasas en varias estructuras cerebrales (Cohen, Sinet, y Heikkila, 1980; Del Maestro y McDonald, 1987). Sin embargo, otros estudios sobre la inhibición de la catalasa han demostrado que parte de la oxidación del alcohol no se ve afectada después de inhibir las catalasas, y han sugerido que algunas otras enzimas deben estar involucradas en este proceso (Aragon et al., 1992; Gill, Menez, Lucas, y Deitrich, 1992; Hamby-Mason, Chen, Schenker, Perez, y Henderson, 1997; Zimatkin et al., 1998). Este es el caso de CYP2E1, que está

presente en el hígado y también en el cerebro (Hipolito et al., 2007), y mediante manipulaciones farmacológicas se ha encontrado que reduce la acumulación de acetaldehído en el cerebro de la rata después de la ingesta de alcohol (Zimatkin, Pronko, Vasiliou, Gonzalez, y Deitrich, 2006). La evidencia sobre el metabolismo del alcohol en el cerebro adulto sugiere que aproximadamente el 60% del metabolismo del alcohol cerebral se explica por la catalasa, el 20% por CYP2E1 (Zimatkin et al., 2006) y el resto por otras fuentes aún por describir (Zimatkin et al., 1998, 2006).

En el segundo paso del proceso metabólico del alcohol, el acetaldehído del sistema periférico y también del sistema central se convierte en acetato por la acción de las enzimas aldehído deshidrogenasa (ALDH). Después de este paso, el acetato se convierte en agua y dióxido de carbono y se elimina del organismo.

2.2 Alcohol y reproducción

El alcohol se ha demostrado que tiene efectos en la reproducción, tanto en humanos como en otros animales. Por ejemplo, en humanos el consumo de alcohol en hombres reduce temporalmente los niveles de testosterona. En los bebedores frecuentes de alcohol se ha encontrado impotencia sexual y un rendimiento deteriorado de la actividad sexual. Además, la adicción conduce a una reducción en los líquidos seminales que podrían reducir la fertilidad (Cicero, 1982; Van

Thiel, 1983). En mujeres hay estudios que muestran que los niveles sanguíneos de alcohol varían considerablemente durante el ciclo menstrual, siendo más altos durante la ovulación e inmediatamente antes de la menstruación (Jones y Jones, 1976). Sin embargo, hay otras variables importantes que también afectan los niveles de alcohol en sangre durante el período reproductivo, como son la edad y el estado nutricional del sujeto. Se sabe que el nivel de alcohol en la sangre aumenta con el envejecimiento, debido a la disminución gradual de la proporción de agua en el cuerpo (Abel y York, 1979). Además, entre personas que padecen adicción al alcohol es fácil de encontrar un estado nutricional deteriorado, lo que agrava los efectos tóxicos del alcohol y tiene consecuencias críticas para el sistema reproductivo y el desarrollo del feto (Abel y Dintcheff, 1984). Más específicamente, en las mujeres alcohólicas, el alcohol interrumpe el ciclo menstrual normal produciendo menstruaciones irregulares o incluso una interrupción completa, ausencia de ovulación e infertilidad (Emanuele, Wezeman, y Emanuele, 2002; Mello, Mendelson, y Teoh, 1993).

Durante la gestación, la metabolización del alcohol tiene sus propias particularidades. En estudios realizados con ratas se ha encontrado que al comparar ratas gestantes con no gestantes las primeras alcanzaban niveles superiores de alcohol en sangre (Sanchis y Guerri, 1986). A pesar de esto, otros estudios encuentran que la tasa de eliminación de alcohol es mayor en ratas gestantes, lo que podría constituir

una estrategia defensiva para el feto en gestación. Debido a que una tasa elevada de eliminación previene de la acumulación de alcohol en diferentes tejidos, este cambio en la metabolización durante la gestación podría servir para prevenir los efectos teratogénicos del alcohol (Badger, Hidestrand, Shankar, McGuinn, y Ronis, 2005). Además, Pedersen, Panter y Collins (1977) encontraron gran proliferación de la enzima ALDH junto con una menor presencia de acetaldehído (Pedersen, Panter, y Collins, 1977), pero del mismo modo, se ha visto que hembras gestantes alcanzan niveles superiores de alcohol y acetaldehído que hembras no gestantes, con la misma dosis de alcohol (Zorzano y Herrera, 1989b). La presencia de ALDH en la placenta parece sugerir también una “protección” del feto frente a los efectos teratológicos del acetaldehído (Abel y Dintcheff, 1984; Robertson y Bacher, 1995).

2.3 Metabolismo del alcohol en el feto

Cuando una mujer embarazada consume alcohol éste atraviesa directamente la placenta (Consuelo Guerri y Sanchis, 1985). No supone un obstáculo para el alcohol, ya que posee una capacidad metabólica de alcohol muy reducida y éste la atraviesa libremente (Heller y Burd, 2014). Una vez en el compartimento fetal, alcanza todos los tejidos y órganos, como el cerebro, y llega a concentraciones similares a las alcanzadas en plasma materno e incluso superiores (Masatoshi

Hayashi, Shimazaki, Kamata, Kakiichi, y Ikeda, 1991; Szeto, 1989; Zorzano y Herrera, 1989a).

A diferencia del adulto, la capacidad hepática que poseen los fetos es mínima, sin apenas presencia de enzima ADH ni de CYP2E1 (Boleda, Farrés, Guerri, y Parést, 1992; Heller y Burd, 2014), por lo que, tras el consumo materno de alcohol, estos requieren del metabolismo materno para eliminarlo (Sanchis y Guerri, 1986). La eliminación total del alcohol del líquido amniótico lleva más tiempo que de la sangre materna. Algunos estudios han encontrado niveles de alcohol en fetos cuando este ya había sido eliminado de la sangre materna (Hayashi, 1991; Nava-Ocampo, Velázquez-Armenta, Brien, y Koren, 2004). Además, los fetos a término tragan activamente líquido amniótico, y con él las sustancias presentes en el mismo, como el alcohol (Lev y Orlic, 1971). A través de la excreción urinaria y de la respiración, dicho alcohol circula del feto de vuelta al líquido amniótico y viceversa, pudiendo alcanzar en el líquido amniótico niveles incluso mayores que en sangre materna y fetal. De este modo, el líquido amniótico actuaría como un "reservorio" de alcohol (Clarke, Steenaart, Slack, y Brien, 1986), y por ello la exposición al alcohol en el feto se prolonga hasta que éste es completamente eliminado (Heller y Burd, 2014).

En cuanto a los niveles de acetaldehído en sangre fetal, se ha encontrado que son nulos o insignificantes, tras el consumo materno de dosis bajas o moderadas de alcohol. Esto se debe principalmente a la acción protectora de la placenta,

tal como se comentó anteriormente. No obstante, puede darse una situación en la que el nivel de acetaldehído materno sea tan elevado que superen las capacidades metabólicas de la placenta. Bajo estas condiciones hay estudios que han encontrado este metabolito en sangre fetal (Espinete y Argilés, 1984; Zorzano y Herrera, 1989b). Por ejemplo, se han detectado pequeñas cantidades de acetaldehído en sangre fetal con la administración de 3g/kg de alcohol a las madres gestantes (Gordon, Baraona, Miyakawa, Finkelman, y Lieber, 1985). En otro estudio en el que se administró directamente acetaldehído a las madres gestantes, en los fetos se detectaba en concentraciones diez veces menores a las maternas (Hayashi, 1991). Por lo tanto, si se superan las barreras protectoras de la placenta, el acetaldehído puede llegar al feto. En este caso, el feto es capaz de metabolizar el acetaldehído a acetato, ya que tanto en el hígado fetal como en la barrera hematoencefálica, la enzima ALDH es activa (Zorzano y Herrera, 1989b).

Asimismo, en estudios realizados en la ontogenia temprana de la rata, se ha observado que el sistema enzimático de catalasas cerebrales está activo, y que mediante este sistema se produce acetaldehído central a partir del alcohol que llega al cerebro (Hamby-Mason et al., 1997). Estos estudios han encontrado que la actividad del sistema de catalasas en el feto es 4.5 veces más elevada que en el adulto por lo que el alcohol pasaría rápidamente a acetaldehído en el cerebro fetal (Hamby-Mason et al., 1997). Sin embargo, la

capacidad del feto para eliminar el acetaldehído del cerebro por medio de la ALDH es limitada debido a la actividad nula o baja de esta enzima en la ontogenia temprana (Zimatkin, 2013). De hecho, se encontró que la actividad de ALDH en el cerebro de la rata era del 45-70% al DP 10 en comparación con un adulto, y se acerca al nivel adulto al DP 20 (Zimatkin y Lis, 1990).

3. EFECTOS DEL ALCOHOL EN LA GESTACIÓN

El consumo de alcohol durante el embarazo causa daños graves al embrión y al feto. Como declaró la Organización Mundial de la Salud (2014) “el uso de alcohol, drogas ilícitas y otras sustancias psicoactivas durante el embarazo puede conducir a múltiples problemas sociales y de salud para ambos, madre e hijo. El consumo de alcohol durante el embarazo puede conducir al síndrome de alcoholismo fetal y a otros daños, como aborto espontáneo, muerte fetal, bajo peso al nacer, prematuridad y defectos de nacimiento”.

A pesar de que las organizaciones mundiales afirman los posibles efectos negativos que ejerce el alcohol, los datos sugieren que las mujeres todavía consumen alcohol durante el embarazo (Berman y Cannon, 1974; Blasco-Alonso et al., 2015; O’Keeffe et al., 2015; Polańska, Jurewicz, y Hanke, 2015; Rausgaard, Ibsen, Jørgensen, Lamont, y Ravn, 2015). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la mayoría de las mujeres descubren sus embarazos semanas después del inicio de la gestación y, por lo tanto, sin saberlo, mantienen su consumo regular de alcohol hasta que se dan cuenta de su condición. Por esta razón es común encontrar una mayor exposición al alcohol fetal durante las primeras semanas de gestación y la tendencia disminuye significativamente a partir de entonces (Blasco-Alonso et al., 2015; Polańska et al., 2015). Sin embargo, algunas mujeres todavía consumen alcohol, al menos en dosis muy bajas durante el resto de la gestación. Por

ejemplo, un estudio reciente realizado en Dinamarca mostró que al menos se detectaba alcohol en orina en el 3,6% de las mujeres a las 12 semanas de gestación (Rausgaard et al., 2015). En España, un estudio encontró que casi el 40,7% de las mujeres habían consumido alcohol en el primer trimestre, el 23,1% en el segundo trimestre y el 17,1% en el tercer trimestre (Blasco-Alonso et al., 2015).

3.1 Efectos teratogénicos del alcohol en la gestación

Paul Lemoine y colaboradores describieron por primera vez las consecuencias adversas del consumo de alcohol durante el embarazo, en 1968, cuando trataba niños de madres alcohólicas. Describieron cuatro categorías para clasificar los daños producidos por el alcohol en la gestación entre los que estaban: morfología facial muy concreta, retraso en el desarrollo, alta frecuencia de malformaciones físicas y retraso psicomotor. Concluyeron que el alcoholismo materno era muy dañino para la descendencia y concretaron que bajo su influencia podían darse: abortos, muerte fetal, partos prematuros, retrasos del crecimiento pre y postnatal, alteraciones psicósomáticas específicas en el rostro y malformaciones generales (Lemoine, 1968; Lemoine, Harousseau, Borteyru, y Menuet, 2003). Posteriormente Jones y Smith (1973) establecieron en su artículo la relación entre afecciones físicas y el consumo de alcohol materno. Encontraron, al igual que Lemoine y colaboradores, que las

principales afecciones podían ser relativas a deficiencias del desarrollo tanto durante el propio embarazo como tras el mismo. También encontraron afecciones relacionadas con alteraciones físicas del cráneo y de la apariencia facial, así como con problemas relacionados con el sistema nervioso central. Fueron estos dos autores quienes nombraron a esta variedad de afecciones como “síndrome alcohólico fetal” (SAF) o FAS en sus siglas en inglés, y determinaron los tres criterios para el diagnóstico: déficit en el desarrollo prenatal y postnatal, evidencia de disfunciones en el sistema nervioso central y anomalías craneofaciales específicas.

Dependiendo de factores como el modo de consumo y la dosis, la exposición a esta droga puede producir diferentes niveles de malformaciones en el feto, que pueden variar desde efectos muy leves, después de la ingesta esporádica de alcohol hasta efectos graves en el caso de una exposición grave, lo que probablemente se ajuste a criterios de diagnóstico de SAF. De hecho, generalmente los niños con un diagnóstico completo de SAF nacen de madres alcohólicas crónicas (Ann Pytkowicz Streissguth, Barr, y Martin, 1983). Sin embargo, solo el 30-45% de los niños de estas madres mostraron los criterios diagnósticos completos y el resto de los niños no fueron diagnosticados porque solo presentaban síntomas parciales. Para clasificar la diversidad de efectos menores al SAF, en 2004 se decidió la denominación Trastornos del Espectro de Alcoholismo Fetal (TEAF; Warren y Murray, 2013). Este concepto, TEAF, es *“un término general que describe el rango de*

efectos que pueden ocurrir en un individuo cuya madre bebió alcohol durante el embarazo. Pueden incluir discapacidades físicas, mentales, conductuales y de aprendizaje con implicaciones para toda la vida” (Chudley et al., 2005). El concepto de espectro se introdujo para incluir todas las diferentes variaciones que aparecen como resultado de la exposición fetal al alcohol y que no necesariamente encajan bien con el diagnóstico de SAF. Esto permite a los profesionales diagnosticar las discapacidades del desarrollo neurológico asociadas con la exposición prenatal al alcohol a pesar de que no hay evidencia física (daño cerebral o anomalías faciales, por ejemplo) de SAF (Kable & Mukherjee, 2017; Kable, Taddeo, Strickland, & Coles, 2015). El instituto nacional de alcoholismo y abuso de alcohol de los EE.UU. (NIAAA), concluye en su informe de 2019, que la severidad de los efectos del alcohol sobre el feto dependerá de: la cantidad de alcohol que la mujer bebe en cada ocasión; la frecuencia con la que bebe; y el momento de la gestación en el que se bebe, pudiendo coincidir con los momentos del desarrollo de un área cerebral o función concreta. Además, se menciona una serie de situaciones que se pueden dar en la madre, que favorece el empeoramiento de las consecuencias del alcohol prenatal, siendo entre otros: malnutrición, consumo de tabaco, ser miembro de una familia de bebedores agudos, tener un índice de masa corporal bajo o alto, etc. (NIAAA, 2021).

La prevalencia, tanto para defectos en el parto y desórdenes del neurodesarrollo relacionados con alcohol como para el FAS, se calcula en 0,5 a 5 niños/as por cada 1000 nacimientos vivos (Thackray y Tifft, 2001). Todo esto hace del alcohol prenatal la primera causa prevenible de discapacidad intelectual y otros defectos del desarrollo. En uno de los estudios más recientes sobre este tema, se estima que en la población general alrededor del 10% de las mujeres consumen alcohol durante la gestación, y que 1 de cada 67 mujeres que beben durante el embarazo tuvo descendencia con diagnóstico de FAS. Estos cálculos indicarían que nacen con FAS aproximadamente 15 de cada 10.000, lo que significa 119.000 nacimientos con FAS por año en todo el mundo (Popova et al., 2017).

3.2 Efectos de la exposición prenatal al alcohol sobre la conducta ante el alcohol

Aunque no se reconoce como un síntoma de TEAF, existe evidencia de una asociación entre la exposición prenatal al alcohol y los trastornos por consumo de alcohol en la descendencia. A pesar de la considerable gama de variables que pueden influir en el consumo de alcohol por parte de los individuos, los pocos estudios longitudinales prospectivos existentes que analizan la relación entre la exposición prenatal al alcohol y el consumo de alcohol por parte de la descendencia, coinciden en un resultado principal: la ingesta

materna de alcohol durante la gestación es uno de los mejores predictores del consumo posterior de alcohol desde la adolescencia hasta la edad adulta (Alati et al., 2006; Baer et al., 1998; Baer, Sampson, Barr, Connor, y Streissguth, 2003; Cornelius, De Genna, Goldschmidt, Larkby, y Day, 2016; Goldschmidt, Richardson, De Genna, Cornelius, y Day, 2019; Griesler y Kandel, 1998; Streissguth, 2007). Al mismo tiempo, numerosos estudios experimentales con animales han demostrado una mayor ingesta de alcohol en la descendencia de las madres que habían consumido alcohol durante la gestación.

3.2.1 Evidencias clínicas

La mayor parte de la evidencia clínica sobre la asociación entre la exposición prenatal al alcohol y los trastornos por consumo de alcohol se deriva principalmente de unos pocos estudios longitudinales. El primero de ellos es el "Estudio longitudinal prospectivo de Seattle sobre el alcohol y el embarazo", en el que se examinaron los efectos de la exposición prenatal al alcohol en una cohorte de niños nacidos en 1974 de madres seleccionadas como representantes de la población del condado de Seattle / King en los EE. UU. (Streissguth, Martin, Martin, y Barr, 1981). En este estudio, entre muchas otras variables, los problemas de consumo de alcohol se midieron en la descendencia a tres edades diferentes: 14, 21 y 25 años. Cuando los sujetos tenían 14 años, se recopilaban

tres conjuntos de datos de 439 familias: consumo de alcohol en adolescentes, antecedentes familiares de problemas con el alcohol e historial de exposición prenatal al alcohol; y utilizando estos datos realizaron análisis correlacionales. Se descubrió que la exposición prenatal al alcohol es un mejor predictor del consumo de alcohol en adolescentes que los antecedentes familiares de problemas con el alcohol (Baer et al., 1998). Cuando estos mismos sujetos tenían 21 años, las familias fueron reevaluadas y se informó que la exposición prenatal al alcohol todavía estaba fuertemente asociada con un mayor número de síntomas de dependencia del alcohol en la edad adulta temprana. Esta relación persiste independientemente de los efectos de los antecedentes familiares de problemas de alcohol, exposición a la nicotina, otras exposiciones prenatales y factores ambientales postnatales, incluido el uso de otras drogas por parte de los padres (Baer et al., 2003). A la edad de 25 años, la asociación entre la exposición prenatal al alcohol y los problemas de consumo de alcohol en adultos todavía estaba presente (Streissguth, 2007). En todos estos casos, los resultados se obtuvieron después de ajustar las características demográficas maternas, el uso materno de tabaco y otras drogas durante el embarazo y los problemas de alcoholismo materno-familiar después del nacimiento. En línea con tales resultados, también se descubrió que la exposición al alcohol durante la gestación es un factor clave para predecir los trastornos por consumo de alcohol en adultos que fueron adoptados al nacer (Yates,

Cadoret, Troughton, Stewart, y Giunta, 1998). En un estudio, 197 adoptados fueron evaluados por el uso de alcohol, tabaco y otras drogas. De ellos, 21 habían recibido exposición prenatal al alcohol y sus resultados se compararon con los de 102 adoptados del grupo control, que no habían recibido exposición al alcohol. Los resultados mostraron que incluso cuando se controlaba el abuso o la dependencia biológica del alcohol entre los padres, el factor de exposición prenatal al alcohol seguía siendo el mejor predictor de los trastornos por consumo de alcohol. Este estudio destaca la relevancia de la exposición al alcohol durante el desarrollo prenatal para el abuso de alcohol en la edad adulta, una relación que parece existir independientemente de las variables confusoras ambientales postnatales (Yates et al., 1998).

Otro estudio de seguimiento, el "Estudio de embarazo y sus resultados Mater-Universidad de Queensland", fue diseñado específicamente para analizar la asociación entre la exposición materna al alcohol y la aparición de trastornos por alcohol. Este estudio se realizó con 2138 participantes nacidos en Brisbane, Australia en 1981, de una cohorte de nacimiento representativa de la población (Alati et al., 2006). Las madres y sus hijos / hijas fueron seguidas desde el embarazo hasta la edad adulta temprana de la descendencia, y el inicio de los trastornos por alcohol se registró desde la adolescencia hasta los 21 años. Los resultados revelaron que la exposición en el útero a tres o más bebidas que contenían alcohol estaba relacionada con trastornos por consumo de alcohol a la edad

de 21 años, aumentando su riesgo en casi 3 veces en comparación con los sujetos expuestos a cantidades más pequeñas de alcohol o aquellos que no habían recibido exposición. Además, informaron que los hijos e hijas de madres que habían consumido 3 o más vasos de alcohol durante el embarazo temprano tenían casi 4 veces más probabilidades de mostrar un inicio temprano de trastornos por alcohol a la edad de 21 años, que aquellos cuyas madres habían consumido menos de 2 bebidas en cualquier momento. Esta asociación fue sólida, incluso después de ajustar una serie de factores biológicos y ambientales (Alati et al., 2006). En otra publicación, se informaron resultados similares cuando los sujetos tenían 14 años (Alati et al., 2008).

Otro estudio prospectivo longitudinal tuvo como objetivo analizar la contribución relativa del riesgo familiar y la exposición prenatal al uso de sustancias en la descendencia. Este estudio se llevó a cabo con una muestra de 209 descendientes de familias de tercera generación del área de Pittsburgh, EE.UU., específicamente seleccionados por tener un riesgo alto o bajo de desarrollar dependencia del alcohol (O'Brien y Hill, 2014). Las familias de alto riesgo se seleccionaron en función de la presencia de dos hermanas dependientes del alcohol y las familias de bajo riesgo se seleccionaron sobre la base de tener un número mínimo de familiares de primer y segundo grado con dependencia del alcohol. Los resultados de este estudio mostraron que la exposición prenatal al alcohol aumentó el riesgo de trastornos

por consumo de alcohol en participantes de alto y bajo riesgo, aunque las madres de alto riesgo tenían más probabilidades de usar alcohol y cigarrillos durante cada trimestre del embarazo. Además, se informó que, entre la descendencia de alto riesgo, los efectos de la exposición prenatal fueron más específicos de la sustancia particular expuesta, es decir, la exposición prenatal al alcohol se asoció con problemas de alcohol en la descendencia, mientras que la exposición al cigarrillo se asoció con el uso del cigarrillo.

Otro estudio analizó el vínculo entre el consumo materno de alcohol autoinformado durante el embarazo y el consumo adolescente autoinformado en una muestra de 185 madres y sus primogénitos reclutados de la Cohorte del Estado de Nueva York (Griesler y Kandell, 1998). El consumo materno se evaluó retrospectivamente, en un promedio de 3.3 años después del parto, con informes que cubrieron un período de 18 meses (incluido el embarazo). Los datos de consumo de alcohol actual y de por vida de adolescentes (de 9 a 17 años) se obtuvieron a partir de autoinformes. Los resultados indicaron que el consumo materno de alcohol durante el embarazo, particularmente el consumo moderado a intenso, se asoció con el consumo actual de su descendencia femenina. Sin embargo, no se encontró asociación entre el consumo materno, ya sea durante o después del embarazo, y el consumo de alcohol en los hijos varones.

Finalmente, se realizó un quinto estudio longitudinal con participantes de cohortes del "Proyecto de Prácticas de

Salud Materna y Desarrollo Infantil". Estos participantes fueron reclutados entre 1983 y 1986, también de Pittsburg, EE. UU., y han sido seguidos desde el cuarto mes de gestación. Los datos de este estudio demostraron que el nivel de consumo de alcohol de los adolescentes (a la edad de 16 años) se predijo directamente por la exposición prenatal al alcohol, así como por los niveles más bajos de rigurosidad de los padres y la exposición al maltrato y la violencia durante la infancia (Cornelius, De Genna, Goldschmidt, Larkby, y Day, 2016a). Estos autores también informaron que el consumo excesivo de alcohol durante la adolescencia se predice directamente por el consumo excesivo de alcohol durante el embarazo de las madres. Se observó una relación similar entre estas variables al analizar los datos recopilados durante la edad adulta, a la edad de 22 años (Goldschmidt et al., 2019). Los resultados de estos estudios, junto con el descrito anteriormente, proporcionan evidencia clara de la conexión directa entre el consumo materno y adolescente, que no solo incluye la dependencia del alcohol y los problemas relacionados con el alcohol.

En resumen, los resultados de todos estos estudios respaldan la existencia de una asociación entre la exposición prenatal al alcohol y el inicio temprano del consumo de alcohol y/o el desarrollo de trastornos por consumo de alcohol en la adolescencia y la edad adulta. Además, la mayoría de estos estudios destacan el papel crítico de la exposición prenatal al alcohol como parte de una vía causal que conduce directa o indirectamente a los trastornos por consumo de

alcohol. Se han propuesto varios mecanismos que podrían subyacer al vínculo entre la exposición prenatal al alcohol y estas consecuencias, aunque los estudios de investigación a este nivel se han realizado principalmente con animales de laboratorio.

En alguno de los pocos estudios de tipo experimental con humanos, se encontró también una relación directa entre los hábitos de consumo de alcohol de madre gestantes y las posteriores preferencias olfativas de la descendencia. En uno de ellos clasificaron a los bebés en función del consumo materno de alcohol como niños cuyas madres eran bebedoras frecuentes y niños cuyas madres eran bebedoras infrecuentes; siendo las infrecuentes comparables a mujeres abstemias y las frecuentes a un consumo moderado de alcohol (Faas, Spontón, Moya, y Molina, 2000). Encontraron que, aquellos niños de madres bebedoras frecuentes, reaccionan de forma más exacerbada y con mayor agitación ante el olor del alcohol en sus primeros días de vida que niños de bebedoras infrecuentes. Además, este estudio sirvió como una nueva evidencia de la especificidad del aprendizaje prenatal, ya que cuando presentaban un olor no etílico y no experimentado prenatalmente, como el limón, ambos grupos de sujetos mostraban las mismas reacciones.

Por otro lado, en otro trabajo se estudió cómo la relación de un infante con el olor del alcohol en el ambiente familiar puede motivar la búsqueda o exploración de ese mismo olor. Para ello emplearon tres juguetes con la misma

aparición, algunos impregnados con olor a alcohol, otros con vainilla y otros sin olor. Los resultados indicaron que los niños con una mayor experiencia con el alcohol se comportaron de manera diferenciada ante juguetes aromatizados con alcohol, manipulando éstos más que otros idénticos, pero con otro olor o sin aromatizar (Mennella y Beauchamp, 1998b).

Por lo tanto, la exposición temprana al alcohol puede darse tanto prenatalmente por consumo materno como postnatalmente en el ambiente familiar. Como se ha comentado antes, los efectos de preferencia por la experiencia prenatal se observan más robustamente cuando van acompañados de la misma estimulación en la etapa postnatal de forma que puede resultar especialmente dañina una exposición combinada (Hepper et al., 2012). Además, es muy frecuente que una mujer que ha bebido durante la gestación, mantenga su consumo tras el parto, exponiendo a su descendencia nuevamente al alcohol y sus propiedades. Hasta hace relativamente pocos años, los profesionales de la medicina animaban a las mujeres gestantes a consumir cerveza u otras bebidas alcohólicas, lo que en teoría aumentaría el apetito de la mujer, generaría un aumento de la producción de leche, mejoraría su sabor y por ende, fortalecería al lactante (Backstrand, Allen, Martinez, y Pelto, 2001; Mennella y Beauchamp, 1998a). Actualmente, la investigación ha demostrado lo contrario, y es que los lactantes incluso disminuyen significativamente su consumo de leche de 3 a 4 horas tras la última ingesta materna de

alcohol. Además, es bien conocido el hecho de que el alcohol puede alcanzar al neonato a través de la leche materna, y que aquellos niños cuyas madres bebieron durante la gestación, se ven atraídos por la leche materna con alcohol (Mennella y Beauchamp, 1998a; Mennella, 1997). Igualmente, los niños pueden experimentar el olor del alcohol en el contexto familiar. En muchas culturas hay una gran presencia del alcohol en la gastronomía, e incluso los niños pequeños llegan a entrar en contacto con él, directamente o a través de los alimentos (Mennella y Beauchamp, 1998a). Por otra parte, el uso del alcohol en otros contextos está muy extendido, como productos desinfectantes, colonias, enjuagues bucales, y en muchas prácticas médicas. Es común limpiar heridas con alcohol, y durante mucho tiempo se ha empleado como antiséptico para facilitar la curación del cordón umbilical, lo que abre la puerta al alcohol hacia el torrente sanguíneo por absorción cutánea (Dalt, Dall'Amico, Laverda, Chemollo, y Chiandetti, 1991).

3.2.2 Evidencias de estudios con animales

La literatura científica cuenta con una gran cantidad de evidencias en animales sobre los efectos teratogénicos del alcohol prenatal (Guerra, 1995; Ann Pytkowicz Streissguth, Landesman-Dwyer, Martin, y Smith, 1980). Asimismo, los efectos conductuales del alcohol después de la exposición prenatal a esta droga también han sido descritos en estudios

con animales. Al igual que lo que ocurre en humanos, estos estudios con animales han encontrado aumento de la atracción por el sabor y el olor del alcohol, que se traduce por ejemplo en un aumento del consumo posnatal de alcohol. Estos trabajos se recogen en la tabla 1.

Los primeros trabajos en investigar este efecto encontraron que una exposición crónica durante toda la gestación generaba hiperactividad junto a un aumento del consumo de alcohol en la descendencia cuando llegaban a la edad adulta (Bond y di Giusto, 1976). Sin embargo, el aumento del consumo no se trató como consecuencia de la exposición al alcohol, sino que atribuían a la hiperactividad la responsabilidad de ese aumento del consumo. Además, otro estudio realizado pocos años antes, encontró una relación positiva entre el consumo de alcohol por parte de la madre y la hiperactividad y problemas con el alcohol en la descendencia, lo que reforzó dicha hipótesis (Cantwell, 1972). La mayoría de los trabajos que continuaron investigando en esta línea, en modelos animales, emplearon exposiciones que duraban toda la gestación, y utilizaban diferentes bebidas alcohólicas. Sin embargo, también se han utilizado exposiciones más reducidas y/o con dosis controladas, con las que se ha vuelto a encontrar un aumento en el consumo por parte de los descendientes. Igualmente, los métodos que empleaban para inducir el consumo materno de alcohol eran variados, desde agregar azúcar a las soluciones de alcohol al uso de alcohol como única fuente de líquidos en la dieta materna. A pesar de

las diferencias metodológicas, la mayoría de los trabajos convergen en que se produjo un aumento del consumo de alcohol en la descendencia. Este aumento del consumo de alcohol después de la exposición prenatal se ha encontrado en edades tempranas, como la infancia, pero también durante la adolescencia e incluso la edad adulta. No obstante, en algunos de aquellos trabajos que encuentran mayor consumo en la adultez, parecen requerir una re-exposición postnatal para observar dicho efecto. Los trabajos mencionados quedan recogidos en varias revisiones sobre la temática (Abate, Pueta, Spear, y Molina, 2008; Chotro, Arias, y Laviola, 2007; Gaztañaga, Angulo-Alcalde, y Chotro, 2020; Spear y Molina, 2005).

4. POSIBLES MECANISMOS DE LOS EFECTOS CONDUCTUALES DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL

Sobre la base de los resultados encontrados en estudios con animales, se han propuesto varios mecanismos para explicar el aumento del consumo de alcohol que se observa después de la exposición prenatal al alcohol. Algunos proponen un vínculo indirecto entre el alto consumo de alcohol y otras alteraciones inducidas por la exposición prenatal, mientras que otros sugieren vías más directas entre el consumo prenatal de alcohol y una mayor aceptación de la droga.

4.1 Mecanismos indirectos

Se ha encontrado un incremento del consumo de alcohol como efecto colateral a otros efectos fisiológicos inducidos por la exposición prenatal al alcohol. En algunos de esos estudios se han propuesto explicaciones para la co-ocurrencia del mayor consumo, sin embargo, no se han demostrado de forma sistemática. Por ejemplo, se ha observado que ciertas variaciones genéticas pueden conducir a diferencias en la susceptibilidad a los efectos teratogénicos del alcohol. En un estudio que utilizó dos líneas de ratas seleccionadas para diferir en la ingesta de alcohol (AA, que prefieren el alcohol y ANA, ratas que evitan el alcohol), se descubrió que la exposición prenatal al alcohol afecta de

manera diferencial el consumo voluntario de alcohol (Hilakivi et al., 1987). Esto se explica por las diferencias en el metabolismo del alcohol entre ambas líneas de ratas. Sin embargo, los autores no ofrecieron ninguna explicación para la conexión entre esta susceptibilidad diferencial a los efectos teratogénicos del alcohol y el aumento del consumo.

Las alteraciones epigenéticas también se han propuesto como un mecanismo por el cual la exposición prenatal al alcohol resulta en una mayor ingesta de alcohol. La transmisión transgeneracional de los efectos inducidos por la exposición prenatal al alcohol se investigó en un estudio que incluyó tres generaciones de ratas (Nizhnikov, Popoola, y Cameron, 2016). Las ratas preñadas fueron administradas con 1 g/kg de alcohol durante los DG 17-20, y la descendencia o la primera generación (F1) se evaluó en términos de ingesta de alcohol y sensibilidad a la sedación inducida por alcohol, en comparación con sujetos expuestos al agua o no tratados. Estos sujetos F1 se aparearon y sus descendientes (F2) se evaluaron en esas mismas medidas, y posteriormente se usaron para producir una F3, que también fue evaluada. Los resultados de estas pruebas revelaron que el consumo de alcohol aumentó en las tres generaciones, y que los efectos sobre la sedación se observaron en F1 y F2, pero no en F3. En base a investigaciones previas, se descartaron diferencias en la atención materna como causa de esta transmisión transgeneracional de una respuesta alterada al alcohol (Popoola, Borrow, Sanders, Nizhnikov, y Cameron, 2015). Sin

embargo, en este estudio no se propusieron mecanismos alternativos para explicar los resultados de aumento del consumo observados en los sujetos de las F2 y F3. La transcripción y los cambios epigenéticos como consecuencia de la exposición prenatal al alcohol se han descrito en varios estudios con animales (Comasco, Rangmar, Eriksson, y Orelund, 2018), y estas modificaciones epigenéticas podrían ser la base de los resultados del estudio realizado por Nizhnikov y colaboradores (2016). La exploración de los mecanismos que vinculan estas alteraciones genómicas y el aumento de la ingesta de alcohol en sujetos expuestos prenatalmente al alcohol constituyen un tema de investigación interesante que requiere una investigación rigurosa. Recientemente, se han tomado medidas preliminares para aclarar este problema en un estudio que analiza los efectos protectores del enriquecimiento ambiental sobre la modulación de la expresión génica, la respuesta de ansiedad y la ingesta de alcohol producida por la exposición prenatal al alcohol (Wille-Bille et al., 2020). Los resultados mostraron que el alcohol prenatal indujo la regulación positiva en los niveles de ARNm del sistema del receptor opioide kappa en la amígdala, así como los niveles de ARNm de prodinorfina en el área tegmental ventral, con el último efecto vinculado a una menor metilación del ADN en el promotor del gen. Estos efectos se normalizaron mediante manipulaciones de enriquecimiento ambiental posnatal. Además, el enriquecimiento ambiental también tuvo un efecto protector

sobre la ingesta de alcohol, siendo este efecto más marcado en machos que en hembras.

Se ha encontrado que el alcohol prenatal altera el desarrollo normal de los sistemas neuroquímicos. En base a datos que muestran que la ingesta voluntaria de alcohol está parcialmente regulada por la actividad del sistema monoaminérgico (Ericson, Blomqvist, Engel, y Söderpalm, 1998; Gonzales y Weiss, 1998) y que la adquisición de hábitos de consumo de alcohol está mediada por el sistema dopaminérgico mesencéfalo (Gianoulakis, 2001), se ha propuesto que la ingesta aumentada de alcohol después de la exposición prenatal se debe a alteraciones en este sistema. Se ha observado que la exposición prenatal al alcohol afecta el desarrollo del sistema dopaminérgico (Aghaie et al., 2020; Shen, Hannigan, y Kapatos, 1999), induciendo, por ejemplo, hiperactividad (Cheng et al., 2018) junto con sensibilidad a los efectos estimulantes del alcohol (Barbier et al., 2009; Becker et al., 1993). Tal como se ha comentado anteriormente, estos efectos, junto con otros efectos fisiológicos y de comportamiento, se han relacionado con un mayor consumo de alcohol en sujetos expuestos prenatalmente al alcohol.

Otros sistemas neuroquímicos que han demostrado estar relacionados con aspectos motivacionales del consumo de alcohol, ya sea directa o indirectamente, y que están afectados por la exposición al alcohol son GABA, serotonina y el sistema opioide (Alfonso-Loeches y Guerri, 2011). Específicamente, se ha demostrado que el sistema opioide

está involucrado en el aumento de la ingesta de alcohol observado en sujetos expuestos prenatalmente a una dosis relativamente baja de alcohol (1 g/kg) (Nizhnikov et al., 2014). En este estudio, se observó que la exposición prenatal al alcohol, además del aumento de la ingesta de alcohol en la descendencia, indujo cambios en el sistema receptor opioide kappa. En particular, se encontró una disminución en la expresión del receptor opioide kappa sinaptosomal en áreas del cerebro implicadas en la respuesta al alcohol. Los autores sugieren que estos cambios en la función y expresión del sistema opioide kappa están involucrados en la ingesta de alcohol postnatal mejorada observada después de la exposición prenatal.

Se han propuesto diferencias en la respuesta al estrés como una forma alternativa de explicar el aumento del consumo de alcohol después de la exposición prenatal. Algunos estudios han relacionado el estrés y el consumo de alcohol a través de alteraciones en el desarrollo del eje HPA y el sistema hipofisario de β -endorfina (Fahlke et al., 2000; Nash y Maickel, 1985; Prasad y Prasad, 1995). Por ejemplo, en un estudio se encontró que la exposición prenatal al alcohol induce una mayor ingesta de alcohol, pero solo cuando las ratas se evaluaron después de un estrés crónico (Nelson, Lewis, Liebeskind, Branch, y Taylor, 1983). Curiosamente, en la mayoría de los estudios, el consumo de alcohol se prueba en condiciones de aislamiento, una situación estresante para las ratas que podría facilitar la observación de los efectos

diferenciales del consumo de alcohol. También se ha demostrado que el aislamiento prolongado durante el desarrollo temprano induce una ingesta aumentada de alcohol en roedores (Kutcher, Egorov, y Chernikova, 2016; Lopez, Doremus-Fitzwater, y Becker, 2011). Además, en un estudio se vió que esta mayor ingesta de alcohol se encontraba más fácilmente en machos adolescentes expuestos al alcohol durante la gestación y la primera semana de lactancia (Fernández, Carrizo, Plaza, Haeger, y Pautassi, 2019). En ese caso, los machos expuestos al alcohol antes y después del parto mostraron una ingesta de alcohol significativamente mayor y una mayor preferencia de alcohol en comparación con los controles no expuestos durante las primeras 5-6 sesiones de prueba, pero solo si se habían alojado en condiciones de aislamiento después del destete.

Los efectos ansiolíticos del alcohol también se han considerado como un mecanismo explicativo del alto consumo de alcohol observado durante situaciones estresantes, especialmente en la adolescencia (Spear y Molina, 2005). Recientemente, se observó que las ratas adolescentes expuestas prenatalmente al alcohol eran más sensibles a la facilitación social y a los efectos ansiolíticos de la intoxicación aguda con alcohol (Mooney y Varlinskaya, 2018). Otro estudio examinó los efectos combinados de la exposición prenatal al alcohol y la separación materna postnatal sobre la respuesta del eje HPA, el comportamiento de ansiedad y la ingesta de alcohol, en la descendencia masculina (Biggio et al., 2018). Los

resultados de este estudio revelaron que los sujetos machos expuestos prenatalmente al alcohol (1 g/kg) no mostraron una mayor ingesta o preferencia por el alcohol en comparación con los sujetos no expuestos o aquellos que experimentaron solamente separación materna. Se descubrió que la separación materna por sí sola aumenta la ingesta de bajas concentraciones de alcohol, mientras que los machos adultos sometidos a ambos tratamientos, el alcohol prenatal y la separación materna, mostraron un aumento en el comportamiento relacionado con la ansiedad y una mayor preferencia por el alcohol en concentraciones bajas y/o altas. El hecho de no observar un efecto sobre la ingesta de alcohol en machos después de la exposición prenatal al alcohol coincide con los hallazgos de otro estudio en el que se encontró un resultado dependiente del sexo después de la exposición prenatal al alcohol, en función de la dosis de alcohol y la edad de la prueba (Chotro y Arias, 2003). Este estudio encontró que, mientras que, en la infancia tanto los machos como las hembras expuestos prenatalmente a 1 o 2 g/kg de alcohol mostraron una mayor ingesta de alcohol, en la adolescencia solo los machos expuestos a la dosis más alta y las hembras expuestas a la dosis más baja consumieron más alcohol que los controles. Posiblemente Biggio y colaboradores (2018) habrían observado un aumento en el efecto del consumo de alcohol en el estudio si las hembras de cada camada hubieran sido incluidas en la prueba.

4.2. Mecanismos de aprendizaje prenatal

Otros mecanismos propuestos para explicar la ingesta elevada de alcohol observada después de la exposición prenatal se basan en la idea de que el feto puede aprender sobre diferentes aspectos del alcohol durante la exposición en el ambiente amniótico y esto puede tener un impacto en la respuesta postnatal a la droga. Tal como se ha comentado en apartados anteriores, los fetos de ratas en los últimos días de gestación (DG 17 hasta el nacimiento) pueden adquirir y expresar formas básicas de aprendizaje, tanto no asociativo como asociativo (Gruest et al., 2004; Smotherman, 1982, 2002b, 2002a; Smotherman y Robinson, 1985, 1988; Smotherman et al., 1988; Stickrod et al., 1982). Teniendo en cuenta que después de la ingestión materna de alcohol, el feto está expuesto al sabor del alcohol, así como a sus efectos farmacológicos, algunos estudios explican el aumento del consumo de alcohol postnatal en términos de un simple efecto de exposición al estímulo, es decir, familiaridad con el sabor del alcohol o habituación a la neofobia, lo que facilita la aceptación inicial de los aspectos quimiosensoriales particulares del alcohol (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010b; Spear y Molina, 2005). Sin embargo, este mecanismo por sí solo no es suficiente para explicar el aumento del consumo de alcohol observado cuando los sujetos son evaluados repetidamente y/o tras un largo período desde la experiencia prenatal (Fabio, Macchione, Nizhnikov, y Pautassi, 2015; Gaztañaga, Aranda-Fernández, y Chotro, 2014).

Un mecanismo que ha sido ampliamente investigado y ha obtenido abundante apoyo en las últimas dos décadas, es uno que vincula el aumento del consumo de alcohol con el aprendizaje asociativo fetal sobre el alcohol (Arias y Chotro, 2005a, 2005b, 2006; Chotro y Arias, 2003; Chotro et al., 2007; Chotro, Arias, y Spear, 2009; Díaz-Cenzano y Chotro, 2010a; Díaz-Cenzano, Gaztañaga, y Chotro, 2014; Gaztañaga et al., 2015; Miranda-Morales, Molina, Spear, y Abate, 2010; Nizhnikov et al., 2014; Youngentob, Kent, y Youngentob, 2012). La hipótesis de trabajo de la mayoría de estos estudios se basa en que el feto adquiere una RC apetitiva al alcohol mediante la formación de una asociación entre el sabor del alcohol (EC) y sus efectos farmacológicos (EI). Dado que los efectos farmacológicos del alcohol están mediados por el sistema opioide, las primeras investigaciones al respecto estudiaron el rol del sistema opioide sobre el aumento del consumo de alcohol tras su exposición prenatal (Chotro y Arias, 2003). Otro de los mecanismos que se ha comenzado a investigar en años recientes es el de los efectos del primer metabolito del alcohol, el acetaldehído.

4.3. El sistema opioide media los efectos conductuales del alcohol prenatal

Con respecto a los efectos farmacológicos del alcohol, varios estudios han explorado el papel implícito del sistema opioide endógeno. Se sabe que este sistema neuroquímico

juega un papel importante en los comportamientos de consumo de alcohol (Gianoulakis, 2001, 2004) y en la mediación de los efectos de refuerzo del alcohol, particularmente el sistema de receptores opioides μ (Acquas, Meloni, y Di Chiara, 1993; Gianoulakis, 2001; Molina-Martínez y Juárez, 2020; Stromberg, Volpicelli, y O'Brien, 1998). Sobre la base de evidencias, se investigaron las propiedades de refuerzo del alcohol durante la gestación a través de la manipulación del sistema opioide prenatal. Los resultados de varios estudios han demostrado que el bloqueo del sistema de receptores opioides con un antagonista no selectivo (naloxona o naltrexona) durante la exposición prenatal al alcohol, evitó la observación de la ingesta aumentada de alcohol en la descendencia, tanto en la infancia como en la adolescencia (Chotro y Arias, 2003; Youngentob et al., 2012). Se encontraron resultados similares cuando se investigó el efecto sobre la palatabilidad del alcohol después de la exposición prenatal (2 g/kg) con o sin el antagonista del sistema opioide. Las crías expuestas prenatalmente al alcohol mostraron una tasa más alta de respuestas apetitivas ante el sabor del alcohol (alta palatabilidad), mientras que los sujetos que recibieron prenatalmente el alcohol junto con naloxona mostraron una disminución en la respuesta apetitiva al sabor del alcohol (Arias y Chotro, 2005b). Sobre la base de estos resultados, se concluyó que la mayor aceptación del alcohol después de la exposición prenatal podría explicarse por una preferencia condicionada aprendida por el feto, que asociaría las

propiedades quimiosensoriales del alcohol con un reforzador positivo que estimula el sistema opioide. Cabe señalar que este aprendizaje prenatal parece ser lo suficientemente persistente como para ser retenido durante al menos cuatro semanas después del nacimiento. Asimismo, se encontró que la experiencia prenatal con alcohol puede interferir con aprendizajes postnatales sobre la droga, reduciendo aversiones condicionadas y potenciando el aprendizaje de preferencias en las que está involucrado el alcohol, tanto como EC como EI (Arias y Chotro, 2006; Chotro et al., 2009).

También se ha encontrado que el sistema opioide fetal puede activarse por acción de alguna sustancia contenida en el líquido amniótico, en ausencia de alcohol y que la activación de estos opioides puede ser responsable de los efectos de refuerzo que tienen lugar en el útero (Korthank y Robinson, 1998). Se ha descrito en una amplia variedad de mamíferos (incluidas las ratas y los humanos), que el líquido amniótico y otros tejidos relacionados con el parto, como la placenta, contienen una sustancia conocida como "factor de aumento de opioides placentarios" (POEF) (Kristal, 1991). Cuando se ingiere, esta sustancia (que aún no se ha identificado químicamente) activa el sistema opioide y potencia los efectos antinociceptivos de los opiáceos, aunque aparentemente no induce ningún efecto analgésico directo (Abbott et al., 1991; Kristal, 1991; Kristal et al., 1990). Otros autores también han propuesto que el líquido amniótico contiene una sustancia que estimula los receptores opioides kappa, por lo que la

denominaron KIF (*"kappa inducing factor"* factor inductor de kappa), que sería funcional en los últimos dos días de gestación (en la rata DG 20-21) (Méndez-Gallardo y Robinson, 2010). Estos investigadores sugirieron que KIF podría ser el agente que media en las preferencias por los sabores experimentados prenatalmente en el líquido amniótico, incluida la mayor aceptación del alcohol observada después de la exposición prenatal a esta droga. Es decir, que, según estos autores, el mayor consumo de alcohol observado en los estudios descritos anteriormente es el resultado de la asociación prenatal entre el sabor del alcohol y los efectos reforzante de esta sustancia KIF, que actuaría como reforzador activando el sistema opioide fetal. Esta hipótesis fue evaluada en dos estudios de nuestro laboratorio. En el primero, teniendo en cuenta que la actividad de KIF se ha sugerido que comienza alrededor de DG 20, la administración prenatal de alcohol antes de estos días (DGs 17-18) no debería producir el efecto de mayor ingesta, mientras que sí se observaría cuando la exposición al alcohol ocurre en los días siguientes (DGs 19-20). Los resultados aparentemente apoyaron la hipótesis de que KIF, y por lo tanto, la estimulación de los receptores opioides kappa, podrían jugar un papel importante como refuerzo en este aprendizaje prenatal (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010a). En un segundo estudio, esta hipótesis fue probada desde otra perspectiva más directa: teniendo en cuenta que KIF actúa directamente sobre los receptores opioides kappa, mientras que los efectos de refuerzo del alcohol están mediados por la

estimulación de los receptores opioides μ , sendos efectos se evaluaron mediante el uso de antagonistas específicos para cada sistema de receptores. Los resultados demostraron que cuando se bloquean prenatalmente los receptores opioides μ , durante la exposición al alcohol, se elimina por completo el efecto de mayor consumo posnatal de alcohol. Sin embargo, el bloqueo del sistema de receptores kappa no anuló dicho efecto. Estos resultados permitieron descartar la posibilidad de que los efectos del líquido amniótico (y de KIF) en el sistema opioide actúen como el reforzador responsable de la respuesta condicionada apetitiva. En cambio, se comprobó que los efectos farmacológicos del alcohol en los receptores opioides μ son críticos para observar el aumento del consumo de alcohol después de la exposición prenatal (Díaz-Cenzano et al., 2014). Coincidentemente, en otro trabajo se demostró un aumento en la actividad de los receptores opioides μ en el área tegmental ventral después de la exposición prenatal al alcohol, junto con la ingesta aumentada de alcohol en la adolescencia (Fabio et al., 2015). En la misma línea, otro trabajo estudió la participación de este sistema de receptores en la atracción generada por la experiencia prenatal con alcohol o con otras sustancias con olor pero sin efectos farmacológicos (Gaztañaga et al., 2014). Se observó que neonatos de rata cuyas madres habían ingerido vainilla o alcohol durante los últimos días de gestación, eran atraídos por el respectivo olor experimentado en útero en mayor medida que por los otros olores. Sin embargo, la administración del antagonista

específico de receptores opioides μ solo anuló la atracción hacia el alcohol, mostrando que la preferencia por el alcohol generada prenatalmente está mediada específicamente por este sistema opioide. Mientras que el mismo no está directamente implicado en la generación de atracciones por otros olores.

5. EL PAPEL DEL ACETALDEHÍDO EN LOS EFECTOS DEL ALCOHOL

5.1. Aspectos generales del acetaldehído

El acetaldehído se puede producir tanto biológica como artificialmente, y se pueden encontrar cantidades significativas de esta molécula en algunos alimentos, bebidas, humo de cigarrillos y gases del escape de automóviles. Es un líquido altamente volátil con un olor desagradable e irritante a temperatura y presión ambiente. Es extremadamente reactivo y tiene una eliminación plasmática muy rápida (Correa et al., 2012). El acetaldehído es un intermediario en las fermentaciones lácticas y alcohólicas, y también es un producto de la fermentación de granos de soja y cereales (Feng, Larsen, y Schnürer, 2007). Por ejemplo, se detecta en pan, té y café instantáneo, granos de café tostados, leche, yogurt y requesón, y en muchas bebidas tanto no alcohólicas como alcohólicas (Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martínez-Rodríguez, Las Heras-Vázquez, y Rodríguez-Vico, 2005; Drake, Lopetcharat, y Drake, 2009; Miyake y Shibamoto, 1993). Como se mencionó anteriormente, el acetaldehído también está presente en el humo del tabaco, en algunos casos a la misma concentración que la nicotina (Hoffmann, Hoffmann, y El-Bayoumy, 2001).

Sin embargo, dado el tema de esta tesis, esta sección se centrará principalmente en el acetaldehído que se deriva de la metabolización del alcohol y los efectos de este metabolito

como responsable de efectos inicialmente atribuidos al alcohol.

5.2. Efectos ansiolíticos del acetaldehído

Entre los efectos del alcohol en dosis moderadas, se encuentran sus efectos ansiolíticos. Estas propiedades se han observado en humanos y roedores (Abrams, Kushner, Medina, y Voight, 2001; Boehm, Reed, McKinnon, y Phillips, 2002). Utilizando pruebas en laberinto en cruz elevado, se observó que, tras la administración de diferentes dosis de alcohol a ratones, estos recorrían por igual tanto los brazos abiertos como los brazos cerrados del laberinto, mientras que los controles administrados con agua recorrían principalmente los brazos cerrados y evitaban los abiertos. Sin embargo, la administración de un inhibidor de las catalasas (Aminotriazole) previo a la administración de alcohol, hizo que los sujetos se comportasen como los controles, es decir, que se habían reducido los efectos ansiolíticos del alcohol. Contrariamente, tras la administración de un potenciador de la acción de las catalasas, los sujetos pasaban más tiempo en los brazos abiertos en comparación con sujetos controles. Además, en el mismo trabajo observaron que la administración de D-penicillamina (secuestrador de acetaldehído) también bloqueaba los efectos ansiolíticos del alcohol (Correa, Manrique, Font, Escrig, y Aragon, 2008). Estos resultados

parecen señalar que las propiedades ansiolíticas del alcohol están mediadas por la acción del acetaldehído central.

5.3. Efectos psicomotores del acetaldehído

Se ha observado que los principales efectos psicomotores del alcohol, como la supresión locomotora o inmovilidad, la falta de coordinación y fallos en la acomodación de la postura corporal son atribuibles al acetaldehído (Correa, Sanchis-Segura, y Aragon, 2001). Estudios realizados con diferentes cepas de ratones han encontrado que, tras una administración de alcohol, ratones sin catalasas sufren de una sedación más larga que ratones normales (Aragon y Amit, 1993; Zimatkin et al., 2006). En humanos con mutaciones en la enzima ALDH2 se demostró que el acetaldehído acumulado periféricamente tenía más impacto en las habilidades motoras y en las funciones psicomotoras que el alcohol en sí mismo (Kim et al., 2010). Se ha sugerido que el acetaldehído acumulado periféricamente produce principalmente efectos propios de la ataxia, como la falta de control muscular y de coordinación; mientras que el acetaldehído central produciría los efectos estimulantes asociados al consumo de alcohol (Correa et al., 2012). En otro trabajo se encontró que secuestrando el acetaldehído central con D-penicilamina, la locomoción inducida por el alcohol se veía disminuida en ratones adultos (Font, Miquel, y Aragon, 2005); efecto que también fue observado en ratas pre-

destetadas (Pautassi, Nizhnikov, y Spear, 2011). En estudios con ratones en los que se ha manipulado farmacológicamente la actividad de las catalasas inhibiéndolas con diferentes sustancias, como la cianamida o la azida de sodio, se ha observado una menor actividad motora producida por el alcohol, en comparación con sujetos controles (Correa, Miquel, y Aragon, 2000; Correa, Miquel, Sanchis-Segura, y Aragon, 1999; Escarabajal, Miquel, y Aragon, 2000; Sanchis-Segura, Miquel, Correa, y Aragon, 1999). Mientras que en otro estudio se vió que el aumento de la actividad de las catalasas aumentó la locomoción inducida por el alcohol (Correa, Miquel, Sanchis-Segura, y Aragon, 1999; Correa, Sanchis-Segura, Pastor, y Aragon, 2004; Correa et al., 2000). Esto indicaría que la actividad motora inducida por el alcohol está estrechamente relacionada con la actividad de las catalasas centrales.

5.4. Efectos reforzantes del acetaldehído

Además del rol ejercido en efectos previamente comentados, se ha observado que el acetaldehído también juega un papel específico en las propiedades motivacionales del alcohol, tanto a nivel apetitivo como aversivo. Este rol como estímulo aversivo se ha encontrado utilizando principalmente condicionamiento por el lugar, tanto apetitivo (CPP) como aversivo (CPA) en función de la dosis de alcohol empleada (Aragon, Sternklar, y Amit, 1985; Parker y Carvell, 1986; Spivak, Aragon, y Amit, 1987b) y mediante la

manipulación enzimática de los niveles de acetaldehído en el sistema periférico (Peana et al., 2008; Spivak, Aragon, y Amit, 1987a). Otros estudios focalizaron más su atención en el acetaldehído generado centralmente y sus propiedades apetitivas. Así, se encontró que secuestrando el acetaldehído producido a nivel central mediante la D-penicillamina se evita el posterior condicionamiento apetitivo por el lugar (Serrano et al., 2007). En el mismo sentido, otro estudio mostró cómo en ratones la D-penicillamina previno el condicionamiento apetitivo, pero no afectó al condicionamiento aversivo por el lugar (Font, Aragon, y Miquel, 2006). Estos resultados parecen señalar que el acetaldehído central no produce condicionamiento aversivo por el lugar.

También se ha evaluado la preferencia inducida por acetaldehído central en crías de rata. La administración de alcohol directamente en el cerebro previa a la asociación con un olor, genera en la cría una preferencia aumentada por un pezón artificial. Sin embargo, la administración de un inhibidor de las catalasas (sodium azide) previa a la administración de alcohol, previno de la adquisición de la preferencia (Nizhnikov, Molina, y Spear, 2007). En la misma línea, Pautassi y colaboradores (2011), demostraron que, en crías de rata predestetadas, la D-penicilamina previno la preferencia condicionada por una superficie táctil, inducida por intoxicación con alcohol (Pautassi et al., 2011). Además de lo anterior, el acetaldehído formado centralmente estaría relacionado directamente con una experiencia reforzante con

el alcohol, produciendo un mantenimiento del consumo (Chen et al., 2009; Hahn et al., 2006; Wall, Thomasson, Schuckit, y Ehlers, 1992). Sin embargo, altos niveles del metabolito en sangre se relacionan con una clara reacción adversa que disuadiría a los usuarios de mantener el consumo (Chao, 1995). De hecho, en población de origen asiático se da una mutación de la enzima ALDH2*2 que produce casi total inactividad de la enzima, lo que a su vez produce una acumulación drástica de acetaldehído periférico. De este modo, con consumos más bajos que en otras poblaciones, estas personas experimentarían una reacción adversa. Esta facilidad para percibir una experiencia negativa tras la intoxicación se ha considerado en sí misma como una protección frente al desarrollo del alcoholismo (Eriksson, 2001; Quertemont, Tambour, y Tirelli, 2005; Tambour y Quertemont, 2007). Es sobre esta noción de los efectos de los niveles periféricos de acetaldehído sobre la que se sustentan algunos de los tratamientos para el alcoholismo: el disulfiram o la cianamida son fármacos que producen una acumulación de acetaldehído periférico con el propósito de provocar una aversión hacia el alcohol.

Del mismo modo, la literatura aporta varias evidencias que relacionan el acetaldehído central con el consumo voluntario de alcohol. En un estudio con ratas, en el que para manipular los niveles de acetaldehído se empleó cianamida (aumentar) y 4MP (reducir), observaron que la cianamida generaba una reducción del consumo de alcohol y que, la

subsiguiente administración de 4MP no generaba ningún cambio, aunque el 4MP efectivamente redujo la acumulación de acetaldehído generada por la cianamida. Este último hecho podría resultar relevante ya que, la regulación de la producción de acetaldehído en el cerebro podría regular el consumo voluntario de alcohol (Sinclair y Lindros, 1981). En otro estudio con un modelo de ratón acatalasémico, se encontró que el rol de las catalasas en los efectos del alcohol podría producirse por su habilidad para metabolizar el alcohol en el cerebro, y que dicha habilidad tiene influencia sobre las conductas generadas por el alcohol (Aragon y Amit, 1993). Además, Karahanian y colaboradores (2011) encontraron un área específica que podría ser clave para la modulación del consumo; mediante un agente anti-catalasas (shRNA) inyectado en al área tegmental ventral observaron una reducción del consumo voluntario de alcohol en un modelo de rata bebedora (UChB). En ese mismo estudio encontraron que la infusión en esta área de un vector lentiviral codificante de ADH1, estimulaba la síntesis de ADH1 y conjuntamente aumentaba el consumo voluntario de alcohol (Karahanian et al., 2011). Todos estos resultados parecen indicar que el consumo de alcohol podría estar modulado por el equilibrio entre niveles de acetaldehído periférico y cerebral. Pero sobre todo, por la expresión del sistema de catalasas y su habilidad para metabolizar el alcohol, es decir de la síntesis de acetaldehído en el cerebro.

5.5. El acetaldehído en la exposición prenatal al alcohol

Una vez que la madre gestante ingiere alcohol, tanto el alcohol como el acetaldehído que escapan al primer paso del hígado, llegan a la placenta a través de la circulación materna. A diferencia del alcohol, el acetaldehído no alcanza el ambiente fetal ni de forma inmediata ni en cantidades significativas (Blakley y Scott, 1984; Zorzano y Herrera, 1989b). Varios estudios con animales después de la administración materna de alcohol encontraron acetaldehído en la placenta, pero cantidades nulas o mínimas en tejidos fetales o en el líquido amniótico (Hayashi et al., 1991; Zorzano y Herrera, 1989b). Se han encontrado enzimas ALDH en el hígado fetal de humanos y otros mamíferos (Cao, Tu, y Weiner, 1989; Fakhoury et al., 2009), así como en la placenta (Blakley y Scott, 1984), aunque en todos los casos, la cantidad y actividad de ALDH es menor que en el hígado adulto. Por lo tanto, parece que esta barrera protectora contra el acetaldehído es efectiva, al menos con las cantidades de acetaldehído acumuladas en la circulación materna en condiciones normales y después del consumo de dosis de alcohol por debajo de 2-4 g/kg. Sin embargo, cuando circulan niveles altos de acetaldehído en sangre materna (por encima de 80 $\mu\text{M/l}$), se puede llegar a detectar acetaldehído en los tejidos fetales (Zorzano y Herrera, 1989b). Este umbral por encima del cual se supera la capacidad metabólica hepática placentaria y fetal del acetaldehído se encuentra con consumo crónico de alcohol, la ingesta extremadamente alta de alcohol o cuando el metabolismo del

acetaldehído se manipula farmacológicamente (Blakley y Scott, 1984; Boleda et al., 1992; Eriksson, 2001; Consuelo Guerri y Sanchis, 1985).

Esta evidencia parece indicar que, después de la ingestión materna, el alcohol ingresa libremente en el compartimento fetal. Dentro de un rango moderado de ingesta de alcohol, el feto está relativamente protegido del acetaldehído periférico proveniente de la madre o producido por el hígado fetal (Clarke et al., 1986). En cualquier caso, cuando se encuentran altas concentraciones de acetaldehído en la circulación sanguínea materna, la cantidad que ingresa al compartimento fetal siempre sería considerablemente menor que la del plasma materno (Zorzano y Herrera, 1989b).

En contraste, se han reportado cantidades relativamente altas de acetaldehído en el cerebro fetal (Hamby-Mason et al., 1997). Dado que las cantidades mínimas de acetaldehído que pueden atravesar la placenta son metabolizadas por la ALDH hepática fetal, así como por la ALDH en la barrera hematoencefálica (Zimatkin, 1991). El acetaldehído detectado dentro del cerebro fetal debe necesariamente producirse in situ a partir del alcohol (Hamby-Mason et al., 1997). El alcohol llega libremente al cerebro fetal donde se transforma en acetaldehído por las catalasas, las principales enzimas responsables de esta transformación tanto en adultos como en el cerebro en desarrollo, lo que representa aproximadamente el 60% de la oxidación del alcohol (Hamby-Mason et al., 1997; Zimatkin et al., 2006).

Además, se encontró que la concentración y actividad de catalasas en el cerebro de neonatos y fetos de rata era mucho más alta que en adultos, lo que podría explicar en parte la mayor cantidad de acetaldehído central que se encuentra en el cerebro del feto (Del Maestro y McDonald, 1987; Hamby-Mason et al., 1997). Al igual que en el hígado, la actividad CYP2E1 en el cerebro adulto y fetal es inducida por la ingestión aguda elevada de alcohol o en respuesta al consumo crónico, y representa el 20-25% de la desintoxicación cerebral de alcohol (Hamby-Mason et al., 1997). Sin embargo, además del acetaldehído, se generan especies reactivas de oxígeno o radicales libres que son moléculas muy reactivas y potencialmente dañinas para los tejidos (Brzezinski, Boutelet-Bochan, Person, Fantel, y Juchau, 1999; Tuma y Casey, 2003). El acetaldehído se metaboliza irreversiblemente a acetato por las enzimas fetales del cerebro-ALDH (Fakhoury et al., 2009).

En resumen, se espera una mayor acumulación de acetaldehído en el cerebro fetal, en comparación con los adultos, con concentraciones de alcohol en sangre similares cuando se considera la combinación de las tres condiciones concomitantes mencionadas: exposición fetal prolongada y continua al alcohol acumulado en el líquido amniótico, mayor actividad del cerebro fetal catalasas, y la menor expresión de las enzimas ALDH en el cerebro fetal. Sobre la base de estas consideraciones, parece que después de la ingesta materna de alcohol, el feto estará expuesto al alcohol en la sangre, el

cerebro y el líquido amniótico, mientras que la exposición al acetaldehído se limita casi exclusivamente al cerebro.

5.5.1. El rol del acetaldehído en los efectos del alcohol en el desarrollo cerebral fetal

Los estudios en humanos y animales han revelado que el sistema nervioso central es particularmente vulnerable a los efectos nocivos de la exposición prenatal al alcohol. Dada su complejidad y desarrollo durante la gestación, e incluso mucho después del nacimiento, no existe un período prenatal seguro para los efectos tóxicos del alcohol y sus metabolitos. Se ha demostrado que muchos de los efectos del alcohol prenatal son atribuibles a la acción de su principal producto de oxidación, el acetaldehído (Eriksson, 2001). Se descubrió que el acetaldehído induce un desarrollo neuronal retardado y malformaciones que coinciden con las observadas después de la exposición prenatal a cantidades relativamente altas de alcohol durante las diferentes etapas de la gestación (Sreenathan, Padmanabhan, y Singh, 1982; Webster, Walsh, McEwen, y Lipson, 1983). Experimentos más recientes realizados a nivel fisiológico también han demostrado que el acetaldehído afecta el desarrollo neuronal al alterar la diferenciación celular, el crecimiento neuronal, la mielinización y a potenciar los efectos nocivos del alcohol (Coutts y Harrison, 2015; Giavini, Broccia, Prati, Bellomo, y Menegola, 1992). Además, la formación de la placenta también

se ve afectada negativamente por las altas concentraciones de acetaldehído, alterando las funciones nutricionales fundamentales para el desarrollo neurológico normal (Lui et al., 2014). Después de la formación de la placenta, el acetaldehído materno no llega al feto, pero se produce abundantemente en el cerebro fetal (Clarke et al., 1986). Estas cantidades de acetaldehído formadas localmente después de la ingestión materna de alcohol parecen suficientes para ser funcionalmente relevantes e inducir una amplia variedad de efectos nocivos en este sistema en desarrollo tan vulnerable (Hamby-Mason et al., 1997).

5.5.2. Conexión entre los efectos conductuales del alcohol y acetaldehído en el feto

Se ha descubierto que el acetaldehído, además de sus consecuencias neurotóxicas, produce efectos conductuales. Dado que muchos de estos coinciden con los del alcohol, se ha sugerido, y más recientemente demostrado, que el acetaldehído media varios efectos del alcohol en el comportamiento (Quertemont y Didone, 2006). En humanos y animales adultos, el acetaldehído induce efectos motores que incluyen estimulación motora a dosis bajas y sedación a dosis altas; efectos de deterioro de la memoria a dosis altas; y efectos ansiolíticos a dosis moderadas, mientras que los efectos motivacionales pueden ser aversivos o apetitosos. Otras consecuencias como los efectos anticonvulsivos y

analgésicos aún no se han demostrado con acetaldehído (Quertemont et al., 2005). Para los efectos motivacionales del acetaldehído, muchos estudios han demostrado que tiene propiedades diferenciales dependiendo de la dosis y el sitio de acción: se ha encontrado que las concentraciones elevadas de acetaldehído periférico son altamente aversivas, mientras que el acetaldehído central induce efectos apetitivos y parece ser responsable del efecto de refuerzo que sostiene el consumo de alcohol (Correa et al., 2012; Quertemont et al., 2005).

5.5.3. Efectos reforzantes del alcohol y el acetaldehído en el feto y en el neonato

Con respecto a las propiedades de refuerzo positivas del alcohol y el acetaldehído en el desarrollo temprano, en ratas recién nacidas se descubrió que la administración de dosis bajas de alcohol junto con un olor inducía una preferencia hacia dicho olor (Petrov, Varlinskaya, y Spear, 2003). Dichas respuestas apetitivas fueron similares si se inyectaba alcohol o acetaldehído directamente en el cerebro del neonato, pero no si se inhibían las catalasas cerebrales o se secuestraba el acetaldehído, confirmando así las propiedades apetitivas del acetaldehído central en ratas neonatas (March, Abate, y Molina, 2013; Nizhnikov et al., 2007). En las etapas prenatales, el alcohol también parece ejercer efectos apetitivos. Cuando se administra alcohol a la rata preñada durante los últimos días de gestación (17-20), el feto se expone simultáneamente a

las propiedades quimiosensoriales (sabor) y farmacológicas del alcohol. Esta experiencia prenatal da como resultado un mayor consumo de alcohol postnatal, así como una mayor apetencia por el sabor del alcohol cuando se prueba en la infancia y la adolescencia (Chotro y Arias, 2003). En general, se acepta que el feto a término puede percibir los estímulos quimiosensoriales presentes en el líquido amniótico durante la deglución y la respiración del líquido, formando asociaciones con sus consecuencias aversivas o apetitivas, lo que modifica las respuestas postnatales a esos estímulos (Smotherman y Robinson, 1988). En consecuencia, se demostró que la mayor aceptación del alcohol encontrada después de la exposición prenatal al alcohol es una respuesta apetitiva condicionada adquirida en el útero (Chotro y Arias, 2003). También se descubrió que esta experiencia prenatal modula el aprendizaje postnatal al retrasar la adquisición de aversiones y facilitar las preferencias aprendidas cuando el alcohol es el reforzador (Arias y Chotro, 2006). Recientemente, se demostró que los efectos de refuerzo del acetaldehído son cruciales para este aprendizaje prenatal del apetito sobre el alcohol, ya que el secuestro de acetaldehído fue capaz de prevenir dicho aprendizaje (Gaztañaga, Angulo-Alcalde, Spear, y Chotro, 2017). El apoyo indirecto adicional proviene de estudios en los que se suprimieron los efectos de refuerzo del alcohol al bloquear el sistema opioide endógeno, en particular los receptores opioides μ , durante la exposición prenatal al

alcohol (Chotro y Arias, 2003; Chotro et al., 2007; Díaz-Cenzano et al., 2014).

Esto es particularmente relevante ya que los efectos reforzadores y estimulantes del acetaldehído derivado del alcohol central parecen estar mediados por el sistema opioide μ (Font, Luján, y Pastor, 2013). Se ha encontrado que el acetaldehído estimula la liberación de β -endorfinas, y el salsolinol parece inducir sus efectos interactuando con los receptores opioides μ en el área tegmental ventral posterior, un elemento de la "vía de recompensa de dopamina" (Xie et al., 2012). Como ya se mencionó, además del acetaldehído, se encontraron altas cantidades de salsolinol en el cerebro fetal después de la exposición crónica al alcohol (Mao et al., 2013), aunque sus efectos conductuales en la ontogenia temprana aún no se han probado.

Aunque los efectos de refuerzo del alcohol y el acetaldehído durante las etapas prenatal y neonatal parecen ser claros (Mao et al., 2013), aún no se ha encontrado evidencia de los efectos adversos del alcohol hasta el día 11 postnatal de la rata (Arias y Chotro, 2006b; Pautassi, Nizhnikov, y Spear, 2009). Además, las mismas dosis de alcohol que son aversivas para adultos o crías de dos semanas, son apetitivas cuando se experimentan prenatalmente o durante la primera semana posnatal (Arias y Chotro, 2006a; Chotro et al., 2009). Este cambio en el desarrollo de los efectos motivacionales del alcohol podría estar relacionado con el estado metabólico de la rata en desarrollo a cada edad. Como se explicó

anteriormente, el feto de rata y el neonato no generan acetaldehído periférico aversivo, debido a la baja o nula actividad de ADH hepática que comienza a aumentar después del nacimiento y alcanza el valor adulto en el día 20 (Boleda et al., 1992), y además, el feto está relativamente protegido del acetaldehído de origen materno. Por el contrario, la intensa actividad de la catalasa cerebral que produce altos niveles de acetaldehído de refuerzo en las etapas fetal y neonatal disminuye gradualmente con el desarrollo (Del Maestro y McDonald, 1987). Por lo tanto, parece poco probable que el feto y el neonato tengan la oportunidad de percibir las consecuencias negativas del acetaldehído periférico durante la intoxicación por alcohol, mientras que sus efectos apetitivos centrales son predominantes. Si se considera que los efectos motivadores percibidos de la intoxicación por alcohol son el resultado del equilibrio entre los niveles periféricos y centrales de acetaldehído (Correa et al., 2012), esto sugiere que los fetos y los recién nacidos percibirán exclusivamente los efectos apetitivos del acetaldehído. Además, la probabilidad de percibir sus propiedades aversivas aumentará durante el desarrollo. Esto implica que el aprendizaje fetal durante la exposición prenatal al alcohol necesariamente generará respuestas apetitivas (figura X). Este mecanismo asociativo podría ser la base del aumento de la apetencia por el olor etílico observado en dos estudios recientes con recién nacidos y adolescentes con antecedentes de exposición prenatal al alcohol (Faas, March, Moya, y Molina, 2015; Hannigan, Chiodo,

Sokol, Janisse, y Delaney-Black, 2015). Del mismo modo, esto podría explicar el aumento del consumo de alcohol observado en muchos estudios en animales con exposición prenatal al alcohol, junto con otros efectos del desarrollo neurológico (Chotro et al., 2007).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de esta tesis es el de analizar las consecuencias de la experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales y/o farmacológicas del alcohol sobre la respuesta postnatal al sabor y olor etílicos, a sus propiedades incondicionales, o a otros estímulos quimiosensoriales experimentados de forma conjunta con el alcohol.

La hipótesis de trabajo de la tesis es que la administración de alcohol durante los últimos días de la gestación de la rata, genera una experiencia prenatal, tanto con las propiedades quimiosensoriales como con los efectos farmacológicos del alcohol, que resulta en una modificación de la respuesta postnatal ante el olor y sabor del alcohol, de las consecuencias incondicionales de esta droga y de la respuesta ante estímulos experimentados de forma conjunta con el alcohol.

Los objetivos e hipótesis específicos son:

1. Investigar cómo afecta la intensidad de la experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales del alcohol, en ausencia de reforzamiento, a la atracción por el olor etílico en neonatos y al consumo y la palatabilidad del alcohol en la infancia. La hipótesis planteada es que una mayor exposición a las propiedades quimiosensoriales del alcohol, en ausencia de acetaldehído, resultará en una mayor atracción neonatal por su olor al DP 1. Mientras que esta misma

experiencia no generará un aumento del consumo y la palatabilidad del alcohol en la infancia.

2. Investigar la posibilidad de que se pueda transferir el valor hedónico apetitivo del alcohol a otro estímulo quimiosensorial expuesto prenatalmente de forma contigua al alcohol, induciendo un incremento en su consumo y palatabilidad en la etapa infantil. La hipótesis planteada es que la experiencia prenatal con un estímulo quimiosensorial junto con los efectos incondicionales apetitivos del alcohol, mediados por el acetaldehído, no solo generará una mayor atracción neonatal por su olor, sino que inducirá también un mayor consumo y palatabilidad de dicho estímulo en la infancia.
3. Asimismo, se planteó detectar y cuantificar el acetaldehído y el alcohol en el tejido cerebral materno y de sus fetos, tras la administración de alcohol a las madres gestantes al DG 20.
4. Investigar si la exposición prenatal a un estímulo quimiosensorial no etílico, tanto solo como en compañía de las propiedades incondicionales apetitivas del alcohol, interfiere en el condicionamiento aversivo de este sabor en la infancia. La hipótesis planteada es que la exposición prenatal a un sabor junto con el alcohol impedirá o retrasará la adquisición postnatal de una aversión condicionada hacia dicho sabor, mientras

que la exposición prenatal solo al sabor facilitará el condicionamiento aversivo postnatal.

5. Investigar si la exposición prenatal al alcohol modifica su capacidad de actuar como estímulo incondicionado aversivo en la infancia y si esto es dependiente de la intensidad de la dosis de alcohol empleada en el condicionamiento. La hipótesis planteada es que la exposición prenatal al alcohol retrasará o facilitará el condicionamiento aversivo con alcohol, en función de la intensidad de la dosis empleada.

METODOLOGÍA GENERAL

SUJETOS

Para todos los experimentos presentados en esta tesis se utilizaron un total de 987 crías de rata de la cepa Sprague-Dawley, derivadas de 118 camadas (en cada experimento se especificará el número de crías y camadas utilizadas). Las ratas nacieron y se criaron en el estabulario de la Facultad de Psicología de la UPV/EHU. La sala de la colonia se mantuvo en un ciclo de iluminación de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, con inicio de luz a las 8:00, y con condiciones de temperatura (21-23°C) y humedad (50-60 %) controladas.

Para contar con estas crías, se emparejaron ratas hembras y machos adultos provenientes del estabulario general de la Universidad. Diariamente tras cada emparejamiento, se realizaron frotis vaginales a las hembras para la detección de esperma con microscopio óptico, y en caso positivo, dicho día se consideró DG0. Todas las hembras cuyos frotis fueron positivos el mismo día se alojaron juntas en parejas o tríos en jaulas de maternidad, hasta el comienzo del tratamiento prenatal (DG 17-20). Una vez terminado el tratamiento prenatal, las hembras se alojaron individualmente hasta el día del parto el DG22. Las jaulas de maternidad se revisaban diariamente por la mañana para el registro de los partos, que se consideró como DP 0. Tras el parto y no más de 48 horas después, todas las camadas eran reducidas a un máximo de 10 sujetos y, en caso de ser posible, se mantuvo un número igual de machos y hembras. Durante la gestación y la lactancia las hembras tuvieron acceso ad libitum tanto a

alimento (PANLAB, España, fórmula de maternidad) como a agua filtrada.

En todos los experimentos se siguió la normativa europea para el cuidado y tratamiento de animales de experimentación y los procedimientos fueron controlados y aprobados por el "Comité de Ética y Cuidado Animal" de la Universidad del País Vasco UPV/EHU (CEEA) y la Diputación Foral de Gipuzkoa, España, de conformidad con la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC).

PROCEDIMIENTOS

Tratamientos prenatales

Los tratamientos prenatales de todos los experimentos se realizaron durante la mañana de los DG 17, 18, 19 y 20. Al comienzo del procedimiento, las madres gestantes se retiran de sus jaulas, se marcan en la cola para su identificación y se registra el peso. Después de ser pesadas, todas las ratas reciben una administración intragástrica (i.g.) de la sustancia correspondiente a cada tratamiento y experimento. La administración i.g. se realiza utilizando un tubo de polietileno de 20 cm de longitud (PE-50 Clay Adams, Parsippany, NJ) unido a una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 24. El tubo se inserta suavemente a través de la boca y se empuja lentamente hacia el estómago, unos 10 cm de cánula, y posteriormente se infunde la sustancia de forma suave pero continua. Todo el procedimiento toma alrededor de 15

segundos por rata. Las sustancias administradas por vía i.g. fueron alcohol, vainilla, 4-MP o agua, con las siguientes concentraciones y dosis:

La dosis de alcohol fue de 2 g/kg. Esta fue administrada en un volumen equivalente a 0,015 ml/g de una solución al 16,8 % v/v de alcohol en agua filtrada.

El 4-MP se administra i.g. junto con la solución de alcohol ya que se ha comprobado que produce los mismos niveles en sangre que por vía intravenosa (Marraffa et al., 2008). La dosis es de 0,13 ml disuelta en 100 ml de la solución etílica antes descrita.

La dosis empleada de vainilla fue de 50 mg/kg de una solución con una concentración al 500 mg%. Con esta dosis se ha comprobado la detección de vainilla en el líquido amniótico (Díaz-Cenzano, Gaztañaga, y Chotro, 2014). El agua fue administrada en volumen equivalente a 0,015 ml/g.

En aquellos experimentos en los que se utilizó el secuestrador de acetaldehído, D-penicillamina, se inyectó por vía subcutánea (s.c.). La administración s.c. se realiza en la zona cervical de la hembra gestante, media hora antes de la administración i.g., dada la especificidad de la droga en interacción con el alcohol. Cada día, una vez finalizado el tratamiento correspondiente, las ratas gestantes se vuelven a colocar en sus jaulas. La dosis empleada para 2g/kg de alcohol se correspondía con 0,7 µl/g de una solución de 7,4 g de D-

penicillamina en 100 ml de salina (50 mg/kg). Los sujetos controles reciben el mismo volumen de vehículo, solución salina.

Procedimientos y pruebas postnatales

Prueba de reactividad al sabor (PRS)

Esta prueba se emplea para estudiar la reacción a los diferentes sabores presentados directamente a la boca de las crías. Se realiza a la mañana del DP 14. Dos crías (una hembra y un macho) de cada camada son separadas de las madres, marcadas para su identificación y canuladas intraoralmente. Para ello se utilizan secciones de polietileno (Clay Adams, PE10) de unos 5 cm. Uno de los extremos de las secciones se calienta para crear un "tope" para que la cánula no se salga una vez colocada en la boca de la cría. Este procedimiento ha sido utilizado ampliamente en este y otros laboratorios (Chotro y Arias, 2007; Díaz-Cenzano et al., 2014; March, Abate, y Molina, 2011). Consiste en pasar la cánula a través de la mejilla de la cría empleando una aguja (32 G), dejando el extremo con el tope en la cara interior de la mejilla y el resto de la cánula sobresaliendo fuera de la boca. El tiempo empleado para canular cada cría no sobrepasa los 10 segundos e induce un estrés mínimo (Spear, Specht, Kirstein, y Kuhn, 1989). Una vez canuladas, las crías permanecen en cajas de metacrilato (15 x 8 x 15 cm) hasta el comienzo de la prueba. Estas cajas se

mantienen a una temperatura de 28-30 °C mediante almohadillas térmicas colocadas debajo de las mismas.

La prueba se realiza en una caja de forma trapezoidal con la pared frontal hecha de material transparente (29 x 12,5 cm) y el resto de paredes (18 x 11,5 cm) y el suelo de espejos. Este juego de espejos permite la observación de las diversas expresiones faciales y movimientos corporales de las crías desde cualquier ángulo. La caja cuenta con dos compartimentos separados para la evaluación simultánea de dos crías. Las crías se colocan una en cada compartimento y se conecta el extremo libre de cada cánula intraoral a una bomba de infusión automática programable (KD Scientific). Las crías permanecen durante un periodo de 10 minutos para su habituación a este nuevo contexto, antes del comienzo de la prueba. La prueba tiene una duración total de 7 minutos y consiste en la infusión de sustancias a la boca a través de la cánula en pulsos de 15 segundos con 45 segundos de intervalo entre infusiones, es decir, reciben 7 infusiones intraorales. En las dos primeras las crías reciben agua y en las restantes cinco el sabor a evaluar. Toda la prueba se registra con videocámaras digitales para el posterior análisis de la conducta de las crías. Una vez finalizada la prueba las crías son devueltas a la caja hogar junto a su madre.

Las sustancias empleadas en esta prueba para la infusión intraoral fueron: vainilla en una concentración de 50 mg % en agua filtrada, alcohol al 6 % v/v en agua filtrada,

vainilla + alcohol (0,05 g de vainillina en 100 ml de solución de alcohol al 6%) y agua filtrada.

En base a estudios previos con crías de rata (Chotro, Kraebel, McKinzie, Molina, y Spear, 1996; Díaz-Cenzano y Chotro, 2010b, 2010a; Hall y Bryan, 1981; Vigorito y Sclafani, 1988) y con ratas adultas (Grill y Norgren, 1978; Parker, 1995; Parker y Carvell, 1986), así como en nuestra propia observación de las reacciones específicas de los sujetos a los distintos sabores empleados en estos estudios, se seleccionaron las siguientes respuestas de las crías:

Respuestas apetitivas:

Movimientos bucales o "Mouthing", dentro de esta categoría se agrupan todos los movimientos bucales de apertura y cierre de la boca, con o sin extensión de la lengua.

Lameteo de las patas o "Paw Licking", es la conducta de lameteo de una o ambas patas delanteras, estando éstas quietas.

Respuestas aversivas:

Trepado de paredes o "Wall-climbing", cuando la cría se mantiene erguida sobre sus extremidades inferiores mientras las anteriores se apoyan sobre alguna de las paredes laterales de la caja de evaluación.

Arcada o "Gaping" consiste en movimientos de apertura extrema y sostenida de la boca.

Movimiento de patas delanteras o "Paw-treading"/ "forelimb-flailing" consiste en un movimiento repetitivo y alternado de extensión y retracción de ambas patas delanteras.

Arrastrar la barbilla o "Chin-rubbing" consiste en la expulsión del líquido que drena de la boca mediante el frotado de la barbilla contra el suelo en un movimiento de atrás hacia delante.

Sacudidas corporales o "Shaking" consiste en un movimiento rápido y repetitivo del cuerpo.

Los dos índices de reacción apetitiva fueron agrupados en una única variable que fue denominada "reacciones apetitivas", mientras que las cinco conductas aversivas se agruparon en una única medida de "reacciones aversivas" (Parker, 1995). Esta transformación ayudó a simplificar la presentación e interpretación de los resultados de todas estas reacciones de los sujetos. Dada la naturaleza de la expresión de dichas conductas, las respuestas apetitivas fueron medidas en duración (segundos) y las aversivas en frecuencia (unidades). El aumento del número de respuestas apetitivas ensayo a ensayo se interpretó como una "valoración" hedónica positiva por parte de las crías, tanto si era acompañada o no por una reducción de las respuestas aversivas (Berridge, 2000).

Prueba de consumo:

Al igual que en la prueba de reacción al sabor, al DP 14 las crías se separan de la madre, se marcan para su identificación y se canulan intraoralmente. Una vez canuladas se colocan agrupadas por camada en cajas de metacrilato calefaccionadas (caja de espera). Antes del comienzo de la prueba, se estimula la micción y la defecación en las crías mediante el frotado de la zona ano-genital con una bola de algodón. Esto se realiza para evitar la pérdida de peso durante la prueba, ya que el consumo se calcula por cambio en el peso corporal de las crías durante la prueba. Las crías se pesan en una balanza de precisión (0,01 g), y una vez pesadas se colocan en uno de los 10 compartimentos (10 x 10 x 20 cm) de la caja de prueba.

Al igual que en la prueba previa, se emplea una bomba de infusión para administrar los fluidos a las crías. En este caso, se programa la bomba para infundir el fluido de forma constante durante 15 minutos. La cantidad total infundida es de 1,5 ml a una velocidad de 0,1 ml/min. Durante la infusión, las crías pueden aceptar o rechazar el fluido, y al finalizar la prueba las crías se pesan nuevamente para determinar la variación pre/post-infusión. El consumo de cada cría se calcula tanto en mililitros consumidos como en porcentaje de peso corporal ganado tras la prueba.

Todas las crías se evalúan primero en una prueba de consumo de agua y una hora más tarde, se evalúa el consumo

de la sustancia con sabor (con la excepción del experimento 4, que sólo se prueba el consumo de la sustancia con sabor al DP 16). Entre ambas pruebas las crías no son descanuladas y se mantienen en la caja de espera con sus hermanos y hermanas. Tras la última prueba todas las crías son descanuladas y devueltas a la caja hogar con su madre. Las sustancias y concentraciones empleadas en esta segunda prueba fueron similares a las descritas en la prueba de reacción al sabor.

Prueba de atracción por el olor:

Dado que la conducta que se evalúa en esta prueba (gateo) es muy singular y que solo se muestra poco después del nacimiento, esta técnica se utilizó como medida de atracción por un olor exclusivamente en neonatos del DP 1.

Esta prueba es una adaptación del procedimiento descrito por Méndez-Gallardo y Robinson (2014). Por cada camada, fueron evaluados una hembra y un macho con cada olor (vainilla, alcohol o agua), midiendo la atracción por el mismo mediante el siguiente procedimiento: se coloca un rectángulo de paño suave (marca Vileda) sobre una almohadilla térmica, creando una base cálida y sólida sobre la cual los neonatos pueden gatear. Esta "pista" tiene a ambos lados marcados los cm para medir fácilmente la distancia recorrida por las crías. Todos los movimientos de los recién nacidos se graban con una videocámara digital colocada a 50 cm por encima de la pista. Para exponer a las crías a los olores,

se coloca una pequeña cantidad (0,3 ml) de la solución de prueba en un tubo de microcentrífuga graduado de 1,5 ml que contiene al fondo una pequeña bola de algodón. Al comienzo de la sesión, los neonatos de cada camada se separan de la madre, marcados para su identificación y luego colocados en grupos según la camada en una incubadora a 35 °C durante un período de 30 minutos para aclimatarse. A continuación, las crías se colocan en caja de espera a 27 °C durante 30 minutos más. Después de este período, los sujetos se evalúan uno a uno, colocándolos en una posición prona al comienzo de la pista, con el hocico alineado con la línea de salida. El experimentador coloca el tubo que contiene el olor inmediatamente frente al hocico de la cría y lo mantiene de forma continua durante un período de 2 minutos. Si el sujeto recorre la pista completa (80 cm) en 2 minutos, se considera que la sesión de prueba para ese sujeto ha acabado. De lo contrario, la sesión termina después de 2 minutos de exposición al olor. Como se menciona en el estudio de Méndez-Gallardo y Robinson (2014), los neonatos de rata pueden perder fácilmente el contacto con el tubo y/o dejar de moverse y posteriormente quedarse dormidos. Cuando el sujeto pierde el contacto con el tubo, éste se vuelve a colocar de inmediato frente al hocico y después de 30 segundos de inactividad, para evitar que los sujetos se duerman, el tubo se retira y se vuelve a colocar delante del hocico del neonato. Mientras los sujetos responden al olor gateando y empujando el tubo, la persona investigadora acompaña el movimiento de

la cría hacia adelante, teniendo cuidado de no interrumpir el comportamiento del sujeto.

La medida que se registra en esta prueba es la distancia en cm recorrida en la pista por cada sujeto, dentro de la sesión de prueba de 2 minutos. Esta medida es registrada inmediatamente por la o el investigador, que es ciego al tratamiento prenatal y a la condición de prueba de cada sujeto. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, todas las pruebas se graban digitalmente y se guardan los archivos de vídeo para proporcionar evidencia de los resultados experimentales y para permitir la revisión de las puntuaciones en caso de error del experimentador.

Los olores empleados en esta prueba fueron: vainilla, 0,2 ml de la solución 500 mg % de vainillina en agua filtrada; alcohol, 0,3 ml de la solución al 6 % de alcohol en agua filtrada; vainilla + alcohol, en las mismas concentraciones que los elementos aislados y agua.

Adaptación de la técnica de la prueba de atracción por el olor:

A pesar de que esta prueba se ha empleado exitosamente en varios experimentos en nuestro laboratorio (Gaztañaga et al., 2017, 2014) tesis de la Dra. M. Gaztañaga, 2016), tiene un aspecto mejorable relacionado con el modo en que se presentan los olores a las crías neonatas. Como se ha explicado, los olores son presentados en un tubo colocado delante del hocico de la cría manualmente por el/la

experimentador/a, quien acompaña el movimiento de la cría a medida que esta avanza atraída por el olor. A pesar de que este procedimiento se realiza lo más delicado y objetivamente posible, sería deseable que esto se hiciera sin dicha intervención. Por ello, se desarrolló un aparato para intentar reemplazar la intervención humana en el procedimiento de evaluación de la atracción por el olor.

Para ello, se diseñó una estructura transversal al pasillo o pista que recorren las crías durante la prueba, montada con rodamientos sobre unos raíles colocados a lo largo a ambos lados de dicha pista. Sobre esta estructura se sujeta el tubo que contiene el olor de tal manera que permite mantener este tubo en la posición correcta, frente al hocico de las crías y adaptar esta posición a sus posibles movimientos verticales y laterales. El peso de la estructura y los rodamientos sobre la que se mueve, permiten que una cría de rata en su DP 1 (peso aproximado 6 g) la pueda mover con facilidad con solo apoyarse sobre el tubo.

Los resultados obtenidos en un estudio piloto realizado con este instrumento arrojaron resultados positivos. Sin embargo, este aparato se construyó una vez acabados los experimentos de esta tesis en los que se empleó esta prueba por lo que no se pudo realizar un experimento para su completa validación, la situación provocada por la pandemia de COVID a partir de 2020 impidió proseguir con estas comprobaciones. Pero se consideró de interés comentar este posible avance en el procedimiento en esta sección de la tesis.

Condicionamiento

En los días de condicionamiento, el procedimiento utilizado fue muy similar al procedimiento de la prueba de consumo. La diferencia principal es que en los procedimientos de condicionamiento sólo se realizó la prueba de consumo del sabor a condicionar (y no del agua). Además, tras la ingesta del sabor a condicionar, se aplicó una inyección intraperitoneal de El (cloruro de litio o alcohol), en función del peso corporal, a cada uno de los sujetos; los sujetos no condicionados recibieron igualmente una inyección tras la ingesta, pero en su caso de solución salina. Tras la inyección, los sujetos eran mantenidos independientemente de sus hermanos no condicionados, para evitar el "efecto del compañero envenenado". De esta manera, en dicho espacio de tiempo los sujetos sufrían el efecto aversivo, para después ser devueltos a la caja hogar junto a su madre correspondiente. Este procedimiento se empleó para cada día de condicionamiento (C1 y C2), por lo que, en el día de la realización del test (T), tras el consumo de la sustancia, no se aplicaban inyecciones.

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, cómo El se utilizó o bien el Cloruro de litio (LiCl) o bien diferentes dosis de alcohol. La solución empleada de LiCl para generar la aversión al sabor fue de una concentración del 1% al 0,15 M. La exposición a un olor/sabor seguida de una administración intraperitoneal de LiCl produce una aversión por dicho estímulo en ratas. Si bien esta aversión es dependiente de la dosis en crías, la empleada es suficiente para generar

aversiones en crías de edades superiores al DP 5. Por otro lado, dos dosis diferentes de alcohol fueron empleados para generar la aversión al sabor: 1 g/kg y 3g/kg. Ambas dosis han demostrado ser suficientes para generar aversiones en crías de rata en la infancia (Arias, Molina y Spear, 2009).

ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados de todas las pruebas fueron analizados empleando ANOVAs. Los datos de las pruebas de atracción por el olor y la prueba de consumo fueron analizados con ANOVAs factoriales o de una vía, dependiendo del diseño de cada experimento. Para evaluar los efectos de los factores y las interacciones se empleó la prueba Post-Hoc de Duncan, y en caso de no arrojar resultados, se emplearon la prueba de Tukey y Fisher LSD, siendo especificada para cada caso en cada experimento.

En un primer análisis, para todos los experimentos y pruebas, la variable Sexo fue analizada, pero tras la comprobación de la carencia de efectos e interacciones de esta variable, se eliminaba del análisis final para facilitar la interpretación de los resultados. El nivel de alfa establecido para todos los análisis fue $\alpha < 0,05$.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

EXPERIMENTO 1: APRENDIZAJE PRENATAL SOBRE LAS PROPIEDADES QUIMIOSENSORIALES DEL ALCOHOL

Está claro que la exposición prenatal al alcohol produce una atracción hacia su olor al DP 1 como un aumento de la palatabilidad y el consumo más adelante en la infancia y adolescencia. Este efecto ha sido descrito como una respuesta condicionada, producida por la asociación entre las propiedades quimiosensoriales del alcohol y un reforzador apetitivo, mediado por el sistema opioide (Arias y Chotro, 2005b; Chotro y Arias, 2003; Gaztañaga et al., 2015). Tal como se ha comentado previamente, dicho reforzador es el acetaldehído producido por la metabolización del alcohol (Gaztañaga et al., 2017). Además, se ha demostrado que el acetaldehído periférico o hepático es responsable de los efectos aversivos del alcohol (Quertemont y Tambour, 2004; Sinclair y Lindros, 1981) y por otro lado, que el acetaldehído central, producido por el sistema de enzimas catalasas, ha sido propuesto como responsable de los efectos reforzantes o apetitivos (Correa et al., 2012; Hahn et al., 2006). Considerando que la capacidad de metabolización hepática de los fetos es prácticamente nula (Boleda et al., 1992; Sanchis y Guerri, 1986) y que los fetos se encuentran protegidos del acetaldehído periférico materno por la placenta al menos con dosis leves o moderadas (Guerri y Sanchis, 1985; Hayashi et al., 1991), se puede suponer que los fetos no perciben los efectos aversivos del alcohol y en cambio sí perciben los efectos reforzante

apetitivos del acetaldehído central (Hamby-Mason et al., 1997; March et al., 2013; Nizhnikov et al., 2007).

Con la exposición prenatal a sabores/olores no etílicos y por lo tanto sin efecto farmacológico que pueda actuar como reforzador, como por ejemplo la vainilla, también se ha observado una atracción por su olor al DP 1. Sin embargo, esta mayor aceptación no perdura hasta el DP 14, como en el caso del alcohol. Tal como se ha comentado, la atracción por estos olores no etílicos inmediatamente tras el nacimiento, se explicaría por un efecto de familiaridad hacia el olor experimentado los días previos. Teniendo esto en cuenta, la presentación del alcohol sin su efecto reforzante durante la exposición prenatal, es decir, solo al sabor/olor etílico, debería generar también una atracción en los neonatos. Sorprendentemente, este efecto de atracción por familiaridad por el olor/sabor del alcohol no ha sido evidente en ninguno de los trabajos en los que se ha eliminado directa o indirectamente el efecto reforzador del alcohol durante la exposición. Así, la exposición al alcohol junto con un antagonista específico de los receptores opioides μ (Naloxonazine) redujo el consumo de alcohol en la infancia (DP 14), pero también impidió la observación de la atracción neonatal por el olor del alcohol observada en sujetos expuestos solo al alcohol (Gaztañaga, Aranda-Fernández, Díaz-Cenzano, y Chotro, 2015). Este mismo resultado fue encontrado cuando se eliminó el acetaldehído durante la exposición prenatal al alcohol, mediante la administración de

D-penicilamina (Gaztañaga et al., 2017). En el caso del bloqueo del sistema opioide, la ausencia de atracción neonatal por el olor etílico en sujetos supuestamente familiarizados con este olor, se podría explicar por uno de los efectos secundarios del bloqueo de estos receptores: una reducción general de las conductas consumatorias. Entre estas conductas se encuentran los movimientos bucales y de ingesta de líquido amniótico del feto, que permitirían percibir los olores y sabores presentes en este líquido (Smotherman y Robinson, 1995). Por lo que los sujetos expuestos al alcohol, en ausencia de reforzamiento por bloqueo de ese sistema, no estarían percibiendo tampoco los aspectos quimiosensoriales del alcohol como para familiarizarse con ellos y luego mostrar una atracción. En el caso de la D-penicilamina, no obstante, no se han encontrado evidencias de que este fármaco interfiera con la percepción del sabor/olor del alcohol. De hecho, la administración prenatal de este fármaco junto con la vainilla, no impide la observación de una atracción neonatal por el olor de la vainilla, lo que indica que la capacidad quimiosensorial fetal es funcional (Gaztañaga et al., 2017).

Sin embargo, tal como se comentó, los neonatos expuestos al alcohol junto con el agente secuestrador de acetaldehído, no muestran atracción por el olor del alcohol. Esto podría estar relacionado con los efectos de la reducción drástica de los niveles de acetaldehído por efecto de la D-penicilamina sobre la oxidación del alcohol. Hay evidencia de que la manipulación de la metabolización del acetaldehído

puede alterar el propio proceso de oxidación del alcohol. Por ejemplo, se ha observado que la inhibición de la enzima ALDH, que induce un incremento en los niveles de acetaldehído circulantes, reduce la tasa de oxidación de alcohol (Fujimiya, Yamaoka, Ohbora, Aki, y Shinagawa, 2002). Por otra parte, también se observó que tras la reducción de los niveles de acetaldehído la tasa de eliminación de alcohol se incrementa (Vind y Grunnet, 1987). Teniendo esto en cuenta, se podría especular que la ausencia de acetaldehído producida por la administración de D-penicilamina junto con el alcohol, induciría un incremento de la velocidad de eliminación del alcohol, reduciendo su acumulación en el líquido amniótico y por ende, disminuyendo la oportunidad de que el feto perciba sus características quimiosensoriales. Esta podría ser la explicación de por qué los fetos expuestos al alcohol en ausencia de acetaldehído no muestran, tras el nacimiento, una atracción por el olor del alcohol. Por lo que en este estudio se intentó observar si dicha atracción neonatal por el olor etílico podía ser observada aumentando los niveles de alcohol circulante en ausencia de acetaldehído. El incremento en la cantidad de alcohol circulante se inducirá por inhibición de la enzima ADH, mediante la administración de 4-metil pirazol (4-MP), y por lo tanto se impedirá el paso de alcohol a acetaldehído (Sarkola, Iles, Kohlenberg-Mueller y Eriksson, 2002). Esto resultaría en un aumento de la cantidad de alcohol circulante y previsiblemente del alcohol que llega al líquido amniótico, potenciando la percepción de su olor y sabor. En

aquellos estudios en los que se administró alcohol junto con 4-MP se observa que los niveles de alcohol en plasma duplican o incluso triplican los niveles de alcohol observados en sujetos controles (Chen, McAlhany y West, 1995; Waller, McBride, Lumeng y Li, 1982). También se ha comprobado que el 4-MP tras pasa la placenta alcanzando en el feto niveles equivalentes a los maternos (Gracia, Latimer & McMartin, 2012).

OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo de este primer experimento es investigar si el incremento de la cantidad de alcohol circulante y, por lo tanto, de alcohol que llega al líquido amniótico, induce un resultado de mayor atracción por el olor del alcohol en neonatos de rata (DP 1). Además, se analizará el efecto de este tratamiento sobre el consumo de alcohol y palatabilidad del sabor etílico en la infancia (DP 14).

La hipótesis de este estudio es que una mayor exposición al alcohol (concentración y duración), en ausencia de acetaldehído, favorecerá la familiarización con sus propiedades quimiosensoriales, lo que resultará en una mayor atracción por su olor al DP 1. Esta atracción será mayor que la observada en sujetos expuestos sólo al alcohol con o sin acetaldehído. Por otra parte, en la infancia (DP 14), se espera que el consumo y la palatabilidad del alcohol sean menores en comparación con los del grupo expuesto prenatalmente al alcohol (en presencia del acetaldehído). Es decir, no esperamos

que la mayor atracción encontrada en la etapa neonatal se refleje en el consumo y la palatabilidad en la infancia.

MÉTODO

Sujetos

Se emplearon ratas Sprague-Dawley y sus crías. Se emplearon un total de 330 crías provenientes de 33 camadas. Los sujetos fueron distribuidos de la siguiente manera en las pruebas postnatales: 198 crías para la prueba de atracción al olor en el DP 1, y 66 crías para la prueba de consumo y 66 crías para la prueba de palatabilidad del DP 14.

Procedimiento

Tratamiento Prenatal:

Cada mañana de los días de gestación (DG) 17 a 20, las hembras gestantes recibieron uno de los siguientes 5 tratamientos prenatales que consistieron en una inyección s.c. y 30 min más tarde una administración i.g. de las sustancias correspondientes a cada grupo. Grupo E (n= 72): salina seguida de alcohol; Grupo E+4-MP (n= 62): salina seguida de la administración de 4-MP con alcohol; Grupo Dp+E (n= 70): D-penicilamina seguida de alcohol; el Grupo Dp+4-MP+E (n= 60): D-penicilamina seguida de la administración de 4-MP con alcohol; y el Grupo A (n= 66): salina seguida de la administración de agua.

Evaluación Postnatal:

Al DP 1 las crías fueron evaluadas en una prueba de atracción por el olor. Los olores evaluados fueron alcohol, vainilla y agua.

Al DP 14, se evaluó el consumo de alcohol y la palatabilidad del alcohol en una prueba de reactividad al sabor.

Análisis de datos:

Los datos de la prueba de atracción por el olor fueron analizados con un ANOVA factorial con las variables independientes Tratamiento prenatal y Olor de prueba, y como variable dependiente los cm recorridos por cada sujeto. Los datos de la prueba de consumo de agua y de alcohol, fueron analizados por separado con sendos ANOVAs de una vía, con la variable independiente Tratamiento prenatal y ml consumidos como variable dependiente. Los datos de la prueba de reactividad al sabor se analizaron con dos ANOVAs de medidas repetidas, uno para las respuestas apetitivas y otro para las reacciones aversivas. En ambos casos la variable independiente fue el Tratamiento prenatal y la medida repetida los Ensayos. Las variables dependientes fueron el tiempo (s) emitiendo respuestas apetitivas, en el primer caso y el número de reacciones aversivas, en el segundo.

RESULTADOS

Prueba de atracción por olor (DP 1)

Los resultados del ANOVA indicaron efectos significativos de las variables Tratamiento prenatal $F(4, 183)= 3,44$, $p < 0,01$ y del Olor de prueba $F(2, 183)= 11,85$, $p < 0,0001$. También se observó una interacción significativa entre ambas variables $F(8, 183)= 2,15$, $p < 0,05$. Los resultados se muestran en la Figura 1a.

El análisis Post-hoc de estos efectos revelaron que, en cuanto al Olor de prueba: el alcohol ejerce significativamente más atracción que la vainilla y que el agua, independientemente del tratamiento prenatal, mientras que no hay diferencias significativas entre la vainilla y el agua. Con respecto al Tratamiento prenatal, el grupo E recorre más distancia que todos los demás menos que el grupo Dp+E+4-MP. Cuando se analiza la interacción, se observa que en la prueba con el olor del alcohol, los sujetos de los grupos E, E+4-MP y Dp+E+4-MP no difirieron entre sí, y recorrieron más cm tras el alcohol que los grupos Dp+E y A. Estos dos últimos grupos tampoco difirieron entre sí. En resumen, estos resultados muestran que los sujetos expuestos prenatalmente a una cantidad relativamente alta de alcohol en presencia o no de acetaldehído (grupos Dp+E+4-MP y E+4-MP) mostraron tanta atracción por el olor del alcohol como los sujetos del grupo E y fueron más atraídos por este olor que los sujetos

expuestos al alcohol en ausencia de acetaldehído (Dp+E) o sin experiencia con el alcohol (A).

Por otra parte, en la prueba con el olor del agua, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Mientras que en la prueba con el olor de la vainilla, solo se observó una diferencia significativa: los sujetos del grupo E recorrieron más cm tras el olor de la vainilla que los sujetos del grupo A.

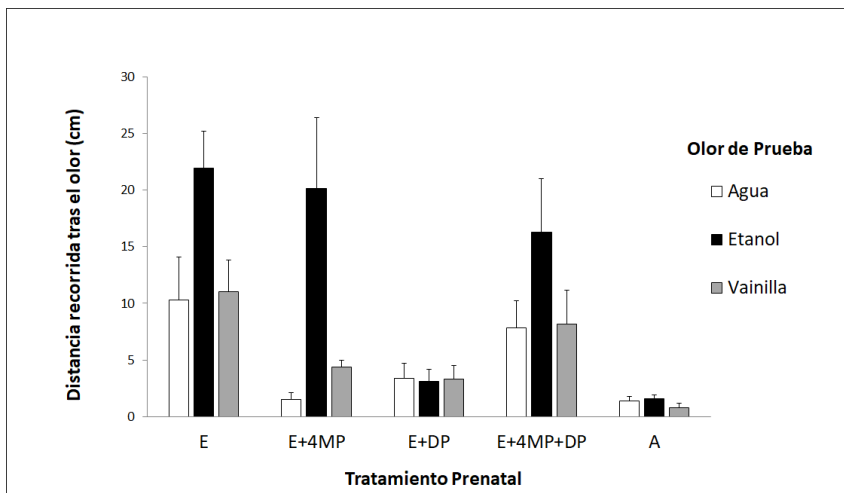


Figura 1a: Media de la distancia recorrida por los neonatos tras el olor del agua, la vainilla o el alcohol (cm) en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Prueba de consumo DP 14.

El consumo de alcohol se vio afectado significativamente por el Tratamiento Prenatal $F(4, 56) = 3,05$; $p < 0,05$. La representación gráfica del resultado se muestra en la figura 1b.

El análisis post-hoc reveló que los grupos E y E+4-MP consumieron significativamente más alcohol que el resto de los grupos. Es decir, los sujetos que habían sido expuestos al alcohol en presencia de acetaldehído, son los únicos que mostraron el mayor consumo de alcohol dos semanas más tarde (al DP 14). En cambio, los sujetos que habían sido expuestos al alcohol, pero en ausencia del acetaldehído, consumieron alcohol en cantidades equivalentes a las del grupo A, que no tenía experiencia con el alcohol.

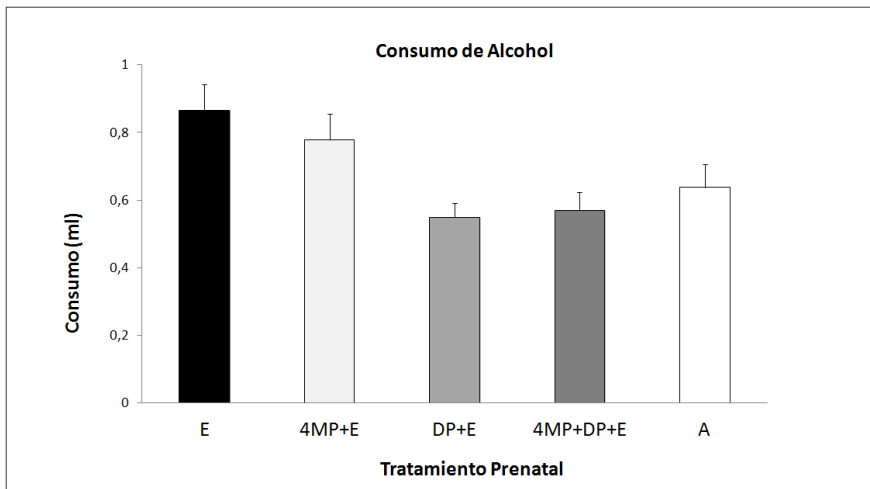


Figura 1b: Media de consumo de alcohol (ml) en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Prueba de Reactividad al Sabor DP 14.

Respuestas apetitivas

El ANOVA indicó efectos significativos del Tratamiento Prenatal $F(4, 56) = 11,64$; $p < 0,01$ y del Ensayo $F(6, 336) = 45,11$, $p < 0,0001$; y la interacción entre ambas variables $F(24, 336) = 1,68$, $p < 0,05$. El gráfico con las respuestas apetitivas y aversivas se muestran en la figura 1c.

Los análisis Post-hoc de la interacción revelaron que todos los grupos mostraron menos respuestas apetitivas durante los dos ensayos con agua que con alcohol sin mostrar diferencias entre ellos. Por otra parte, durante los ensayos con el sabor del alcohol, en algunos ensayos hubo diferencias significativas entre los tratamientos prenatales. En vista de estos resultados, realizamos un segundo ANOVA de una vía incluyendo solo las respuestas totales al alcohol de cada Tratamiento prenatal. El resultado del análisis indicó un efecto significativo del Tratamiento prenatal $F(4, 60) = 10,56$, $p < 0,001$; y el análisis de este efecto reveló que los sujetos del grupo E y del grupo E+4-MP mostraron más respuestas apetitivas ante el alcohol que los demás grupos. A su vez, los sujetos del grupo Dp+E+4-MP y el grupo A mostraron más respuestas apetitivas que el grupo Dp+E.

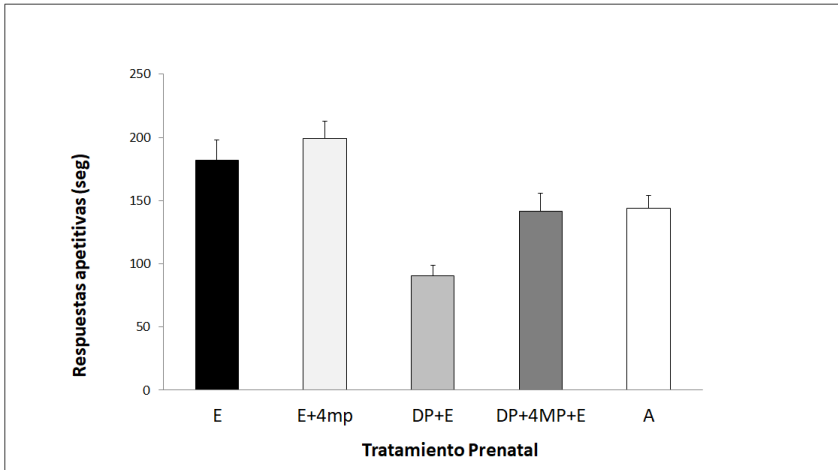


Figura 1c: Media de las respuestas apetitivas ante el sabor del alcohol (seg) en función de los diferentes tratamientos prenatales durante los 5 minutos de la prueba. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Respuestas aversivas

A pesar de la baja frecuencia de reacciones aversivas, el ANOVA indicó efectos significativos del Tratamiento Prenatal $F(4, 56) = 4.26$; $p < 0,01$ y del Ensayo $F(6, 336) = 14.75$, $p < 0,0001$; y la interacción entre ambas variables $F(24, 336) = 1,73$, $p < 0,05$. El resultado correspondiente a la dimensión aversiva se muestra en la figura 1d.

Al igual que en el caso de las respuestas apetitivas, se hizo un segundo análisis solo con las respuestas al alcohol que indicó efectos significativos del Tratamiento prenatal $F(4, 56) = 5.83$, $p < 0,001$. El análisis post-hoc reveló que el grupo E+4MP+Dp fue aquel con mayores respuestas aversivas hacia

el sabor del alcohol, en comparación con el resto de grupos, los cuales no difirieron significativamente entre sí.

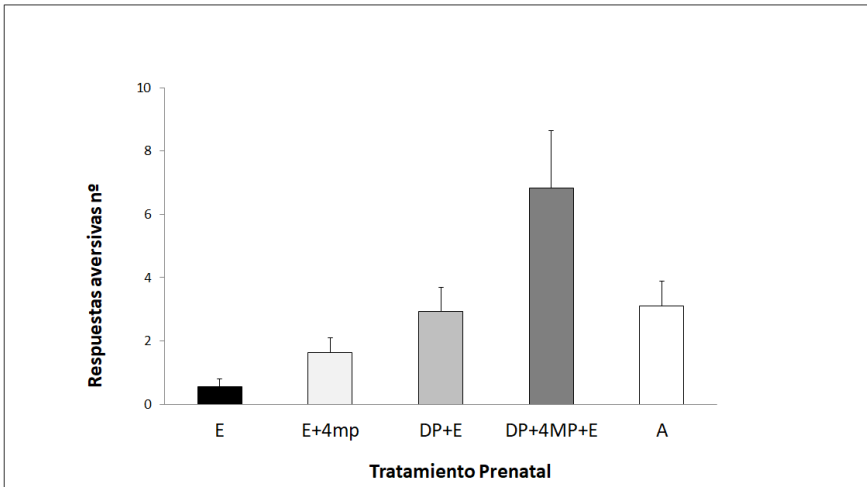


Figura 1d: Media del número de respuestas aversivas ante el sabor del alcohol en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento muestran que, aumentando la cantidad de alcohol disponible durante la gestación, para favorecer la percepción quimiosensorial del alcohol en ausencia del acetaldehído, se puede observar la atracción neonatal por el olor del alcohol. Sin embargo, esta atracción observada al DP 1 no se tradujo en un mayor consumo ni en una mayor palatabilidad del sabor del alcohol en la infancia (DP 14). Estos resultados apoyan la hipótesis que guía este estudio y coinciden con resultados previos de este laboratorio. Es decir, que tras la experiencia prenatal con

alcohol la atracción por su olor al DP 1 se observa cuando el acetaldehído ejerce su efecto reforzante (grupos E y E+4-MP) o, si este está ausente, si la cantidad de alcohol es suficientemente elevada como para asegurar su percepción por parte del feto (Dp+E+4-MP). Por lo tanto, la falta de atracción por el olor etílico observada en los neonatos del grupo Dp+E, se podría interpretar como una menor percepción prenatal del olor del alcohol y/o un déficit en la retención de esa memoria, como consecuencia de la ausencia de un reforzador (el acetaldehído). La posible insuficiente percepción del olor del alcohol en este último grupo podría deberse a un efecto de la D-penicilamina sobre el metabolismo del alcohol. Es decir, el rápido secuestro de acetaldehído por parte de este fármaco podría estar acelerando el primer paso de oxidación del alcohol con su consiguiente reducción de alcohol circulante. Se ha demostrado que la acumulación de acetaldehído en sangre reduce la actividad de la alcohol deshidrogenasa (Crabb, Matsumoto, Chang, y You, 2004). Sin embargo no hay datos claros sobre el efecto contrario, es decir, si la rápida eliminación del acetaldehído en cuanto este es producido, acelera la oxidación y eliminación del alcohol. Si este fuera el caso, esto podría explicar por qué los fetos expuestos al alcohol en presencia de la D-penicilamina (responsable de la rápida eliminación del acetaldehído) tendrían una exposición reducida al alcohol, tanto en tiempo como en cantidad; y por ende, no mostrarían el efecto de atracción esperado. Esta explicación no encontraría apoyo en

algunos estudios en los que se midieron los niveles de alcohol en sangre 15 y 30 minutos después de la administración de D-penicilamina, no se observaron diferencias en este indicador (Font et al., 2005). Sin embargo, dichos estudios no se han realizado aún en ratas gestantes, cuando se sabe que hay cambios en los sistemas enzimáticos encargados de la eliminación del alcohol (Badger et al., 2005; Consuelo Guerri y Sanchis, 1985).

Cuando estos sujetos fueron evaluados durante la infancia (DP 14) se observó un mayor consumo de alcohol, pero solo en aquellos grupos expuestos al alcohol en presencia de acetaldehído (grupos E y E+4-MP). Mientras que los sujetos de los grupos a los que se les eliminó el acetaldehído durante la exposición prenatal al alcohol (grupos Dp+E y Dp+E+4-MP), consumieron cantidades de alcohol similares a las del grupo control expuesto al agua (grupo A). Cabe destacar que ni siquiera los sujetos expuestos a una cantidad más elevada de alcohol, pero en ausencia de acetaldehído (grupo Dp+E+4-MP), mostraron un aumento de su consumo de alcohol en la infancia. Todos estos efectos descritos son una respuesta específica al sabor del alcohol, ya que los diferentes tratamientos prenatales no afectaron de forma diferencial al consumo de agua.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se evaluó a esta edad la palatabilidad del sabor del alcohol. No se observaron diferencias entre grupos en las respuestas apetitivas o aversivas ante el sabor del agua. Pero sí se

observaron más respuestas apetitivas ante el sabor etílico en aquellos grupos con tratamiento prenatal de alcohol en los que estaba presente el acetaldehído (grupos E y E+4-MP), que en el resto de grupos. Además, se observó que los sujetos del grupo Dp+E fueron los que menos respuestas apetitivas emitieron ante el sabor del alcohol, incluso menos que los sujetos sin experiencia previa con alcohol (grupo A) o que los que tuvieron la experiencia con una cantidad aumentada de alcohol, pero sin acetaldehído (grupo Dp+E+4-MP). En cuanto a las reacciones aversivas ante el sabor del alcohol, a pesar de que no fueron muy frecuentes, se observó que el grupo que reaccionó con más respuestas de este tipo, en comparación con los demás grupos, fue el expuesto a la mayor cantidad de alcohol en ausencia de acetaldehído (grupo Dp+E+4-MP). Mientras que el resto de sujetos no mostraron casi reacciones aversivas ante el alcohol. Este resultado podría estar relacionado con un aumento en la sensibilización a los aspectos aversivos (irritantes) del sabor del alcohol por la experiencia prenatal a niveles aumentados de alcohol por el 4-MP. Resultados de sensibilización a los aspectos sensoriales del alcohol han sido descritos tanto por su preexposición prenatal como postnatal (Chotro y Spear, 1997a; Díaz-Cenzano y Chotro, 2010b).

Estos resultados obtenidos al evaluar el consumo y la palatabilidad apoyan la hipótesis de que para observar una mayor aceptación del alcohol en la infancia (consumo y palatabilidad), es necesaria la presencia de un reforzador

apetitivo durante la experiencia fetal con el olor y sabor del alcohol. Es decir, durante la exposición al alcohol, en ausencia de los efectos psicofarmacológicos del acetaldehído, el feto no adquiere un aprendizaje condicionado apetitivo hacia el olor etílico. Por lo tanto, la memoria generada en el útero puede inducir a una mayor atracción por el olor del alcohol poco tiempo después del nacimiento, por un efecto de familiaridad, pero esta memoria no es retenida hasta la infancia.

EXPERIMENTO 2: APRENDIZAJE PRENATAL POR LA ASOCIACIÓN ENTRE UN SABOR NEUTRO Y LAS PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL ALCOHOL

En base a los resultados del experimento anterior, queda claro que la observación en neonatos de una mayor atracción hacia el olor de una sustancia experimentada en el útero, poco antes del nacimiento, no implica que esta preferencia se refleje en el mayor consumo o aceptación de esta sustancia en la infancia. Tal como se ha comentado previamente, esto se ha observado en estudios en los que se administró a la madre gestante sustancias como cineol (olor a eucalipto), anetol (olor a anís), vainillina (olor a vainilla) o alicina (olor a ajo) (Gaztañaga et al., 2015). Todas estas sustancias que tienen olores muy característicos y que sabemos que, al ser consumidas por la madre llegan al líquido amniótico, no tienen efectos neurofarmacológicos, al menos en las dosis en las que se han utilizado en esos estudios. Por lo que durante su exposición prenatal no existe un reforzador explícito que pueda generar un aprendizaje condicionado, apetitivo o aversivo.

Existen evidencias de que el feto puede adquirir una aversión al olor y sabor de una sustancia experimentada en el líquido amniótico, cuando se presenta de forma simultánea un reforzador aversivo (Gruest et al., 2004; Mickley et al., 2013; Stickrod et al., 1982). Incluso en un estudio se observó una

aversión hacia el sabor del cineol cuando este fue experimentado en el útero junto con el alcohol (Abate, Spear y Molina, 2001; Abate, Varlinskaya, Cheslock, Spear y Molina, 2002).

Sin embargo, no hay estudios en los que se haya utilizado un reforzador apetitivo explícito, que genere una preferencia condicionada por estos olores no etílicos. Sabiendo que el acetaldehído derivado de la metabolización del alcohol puede actuar como un reforzador apetitivo para el feto de rata, surge la pregunta sobre si este efecto reforzante del alcohol puede inducir también un condicionamiento apetitivo de otras sustancias con olor y sabor, diferentes al alcohol.

OBJETIVOS Y HIPÓTESIS

El objetivo principal del presente experimento fue el de investigar si la posibilidad de que se pueda transferir el valor hedónico apetitivo del alcohol a la otra sustancia que solo tenga sabor y olor, tal como la vainilla, induciendo no solo una mayor atracción neonatal por su olor sino también un incremento en su consumo y palatabilidad en la etapa infantil. Otro objetivo fue el de poner a prueba el papel del acetaldehído como el principal reforzador en este aprendizaje fetal hacia el olor y sabor de la vainilla.

La hipótesis de trabajo es que la experiencia prenatal con la vainilla junto con el alcohol no solo generará una mayor

atracción por su olor inmediatamente tras el nacimiento, sino que inducirá también un mayor consumo de vainilla y aumentará la palatabilidad de su sabor en la infancia. Asimismo, el secuestro de acetaldehído durante la experiencia prenatal con vainilla y alcohol impedirá la adquisición de este aprendizaje apetitivo fetal, por lo que se observará una mayor atracción por el olor de la vainilla en la etapa neonatal pero no se observará un incremento de la aceptación de esta sustancia en la infancia.

MÉTODO

Sujetos

Se emplearon 292 crías provenientes de 42 ratas Sprague-Dawley. Los sujetos fueron distribuidos de la siguiente manera en las pruebas postnatales: 155 crías para la prueba de atracción al olor en el DP 1, y 137 crías para la prueba de consumo y palatabilidad del DP 14.

Procedimiento

Tratamiento Prenatal:

Cada mañana de los días de gestación (DG) 17 a 20, las hembras gestantes recibieron uno de los siguientes 4 tratamientos prenatales que consistieron en una inyección s.c. de salina o D-penicilamina y 30 min más tarde una administración i.g. de vainilla, o vainilla con alcohol o agua, según el grupo de tratamiento. El grupo V (n= 98): salina

seguida de vainilla; grupo VE (n= 107): salina seguida de la administración alcohol junto con vainilla; grupo DP+VE (n= 112) D-penicilamina seguida de la administración de alcohol junto con vainilla; y el grupo A (n= 79): salina seguida de la administración de agua.

Evaluación Postnatal:

Al DP 1 las crías fueron evaluadas en una prueba de atracción por el olor. Los olores de prueba fueron vainilla y vainilla + alcohol. Al DP 14, las crías fueron evaluadas en pruebas de consumo de vainilla o de vainilla con alcohol; o en la prueba de reactividad al sabor de la vainilla o de la vainilla junto con el alcohol.

Análisis de datos:

Los datos de la prueba de atracción por el olor fueron analizados con un ANOVA factorial con las variables independientes Tratamiento prenatal y Olor de prueba, y como variable dependiente la distancia recorrida por cada sujeto.

Los datos de la prueba de consumo de vainilla y de vainilla con alcohol fueron analizados por separado con sendos ANOVAs de una vía, con la variable independiente Tratamiento prenatal y mililitros consumidos como variable dependiente.

Los datos de la prueba de reactividad al sabor se analizaron con dos ANOVAs de medidas repetidas para cada sabor evaluado (vainilla y vainilla con alcohol), un ANOVA para las respuestas apetitivas y otro para las reacciones aversivas. En ambos casos la variable independiente fue el Tratamiento prenatal y la medida repetida los 7 Ensayos de la prueba (2 ensayos con agua y 5 ensayos con el sabor de prueba). Las variables dependientes fueron el tiempo (s) emitiendo respuestas apetitivas, en el primer caso y el número de reacciones aversivas, en el segundo.

RESULTADOS

Prueba de atracción por olor al DP 1

Los resultados del ANOVA indican un efecto significativo del Tratamiento Prenatal $F(3, 147) = 25,22$; $p < 0,0001$, del Olor de prueba $F(1, 147) = 23,88$; $p < 0,0001$ y de la interacción de ambas variables Tratamiento Prenatal x Olor de prueba $F(3, 147) = 10,52$; $p < 0,0001$. Los resultados se muestran en la figura 2a.

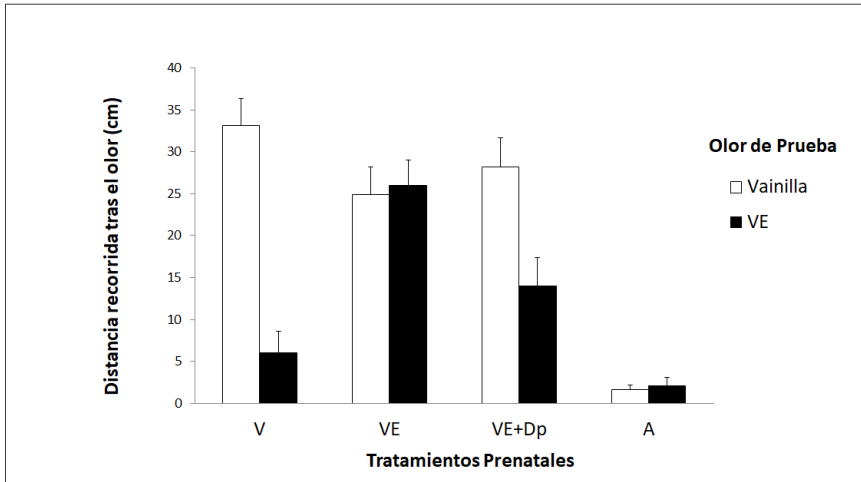


Figura 2a: Distancia en cm recorrida tras el olor de la vainilla y del olor vainilla+alcohol, en función de los diferentes tratamientos prenatales.

El análisis post-hoc de Duncan de la interacción de las variables, reveló diferencias significativas, tanto intra como inter-grupales.

Comenzando con las diferencias intra-grupo, los sujetos expuestos prenatalmente a la vainilla (grupo V) recorrieron una distancia mayor tras el olor de la vainilla en comparación con las crías del mismo tratamiento prenatal evaluadas con el olor de la vainilla junto con el alcohol. En cuanto a los sujetos tratados prenatalmente con vainilla y alcohol (grupo VE), tanto en la prueba de vainilla como en la de vainilla y alcohol, recorrieron una distancia similar tras ambos olores. Por otro lado, los sujetos expuestos a la vainilla y alcohol junto con D-penicilamina (grupo Dp+VE) evaluados en la prueba de Vainilla recorrieron más distancia tras la vainilla que sus "congéneres"

evaluados con la mezcla de vainilla y alcohol. Por último, el grupo de sujetos expuestos prenatalmente al agua (grupo A) recorrió relativamente pocos cm y no mostró diferencias en la distancia recorrida en ambas pruebas.

En cuanto a los resultados entre grupos, en el gráfico pueden observarse algunas diferencias que resultaron significativas. La primera y más evidente de todas, puede observarse en la prueba con el olor vainilla (barras blancas). Todos los grupos cuyos tratamientos prenatales incluyen la vainilla (grupos V, VE y Dp+VE), recorrieron distancias similares tras el olor de la misma, pero significativamente mayores que el grupo tratado con agua (grupo A). En cuanto a la prueba con el olor de la vainilla y alcohol (barras negras), encontramos que el grupo VE fue el que más distancia recorrió tras el olor en comparación con el resto de grupos. En esta misma prueba, el grupo Dp+VE recorrió más centímetros tras el olor que el grupo A, quedando el grupo V entre ambos grupos y sin diferenciarse ni del grupo Dp+VE ni del grupo A.

En resumen, todos los sujetos expuestos prenatalmente a la vainilla, tanto sola como en compuesto con alcohol, fueron atraídos por su olor cuando fueron evaluados tras el nacimiento, en comparación con los sujetos tratados con agua. Los sujetos expuestos solo a la vainilla no mostraron atracción alguna por el olor del compuesto vainilla-alcohol. La exposición prenatal conjunta de vainilla y alcohol generó atracción tanto al olor de la vainilla como a la mezcla de ambos olores. Pero cuando esta experiencia prenatal tuvo lugar en

ausencia de acetaldehído, los sujetos mostraron una clara atracción por la vainilla y en menor medida por el compuesto de vainilla y alcohol. Los sujetos sin experiencia con estas sustancias no mostraron ninguna atracción por los olores de las mismas.

Prueba de consumo al DP 14

El ANOVA indicó un efecto significativo de la variable Tratamiento Prenatal $F(3, 28) = 6,65$; $p < 0,005$. El análisis post hoc reveló que el grupo VE consumió más vainilla que el resto de grupos ($p < 0,001$ - $p < 0,01$). Estos datos se muestran en la figura 2b.

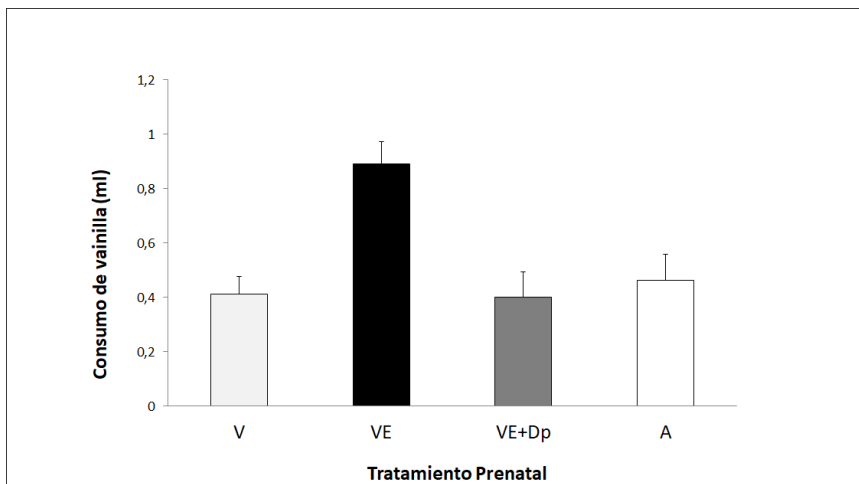


Figura 2b: Media del consumo de vainilla (ml) en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Prueba de reactividad al sabor al DP 14

Respuestas apetitivas: El análisis de las respuestas apetitivas durante los siete ensayos indicó un efecto significativo de la variable Ensayo $F(6, 432) = 24.6$, $p < 0,001$, pero no se observó ni un efecto de la variable Tratamiento prenatal ni la interacción entre ambas variables. El análisis del efecto de Ensayo mostró que, independientemente del Tratamiento prenatal, todos los grupos mostraron más respuestas apetitivas ante el agua en el primer ensayo que en el segundo. Además, en el primer ensayo con el sabor de la vainilla se observan más respuestas apetitivas que en los siguientes cuatro ensayos con el sabor. A su vez, las respuestas en el segundo ensayo con vainilla son mayores con respecto a las de los siguientes tres ensayos. Las respuestas en estos últimos ensayos con el sabor fueron menores y no difirieron significativamente entre sí. Estos datos se muestran en la figura 2c. Estos resultados indican que, independientemente de los diferentes tratamientos prenatales, las crías mostraron respuestas apetitivas como reacción inicial tanto al sabor del agua como de la vainilla, respuestas que fueron disminuyendo en los siguientes ensayos, reflejando un proceso de habituación. El gráfico que representa estos datos, contemplando el tratamiento prenatal, se muestra en la figura 2d.

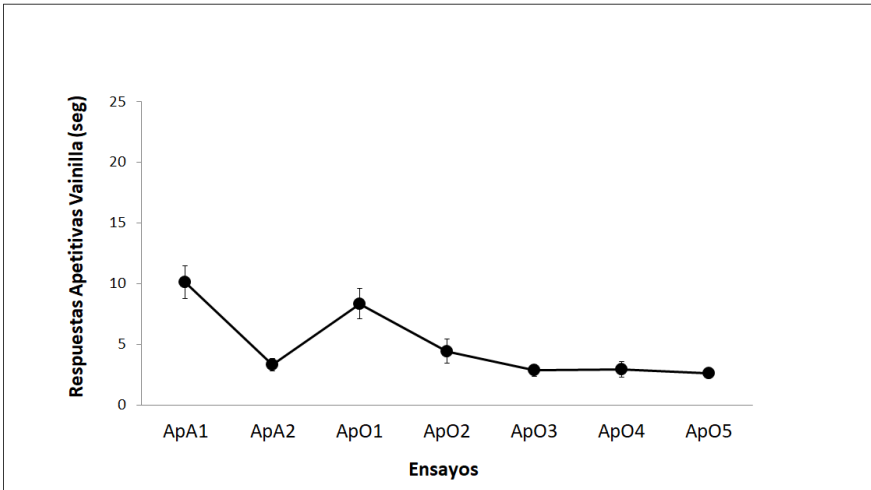


Figura 2c: Media de respuestas apetitivas a la vainilla (seg) en cada ensayo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

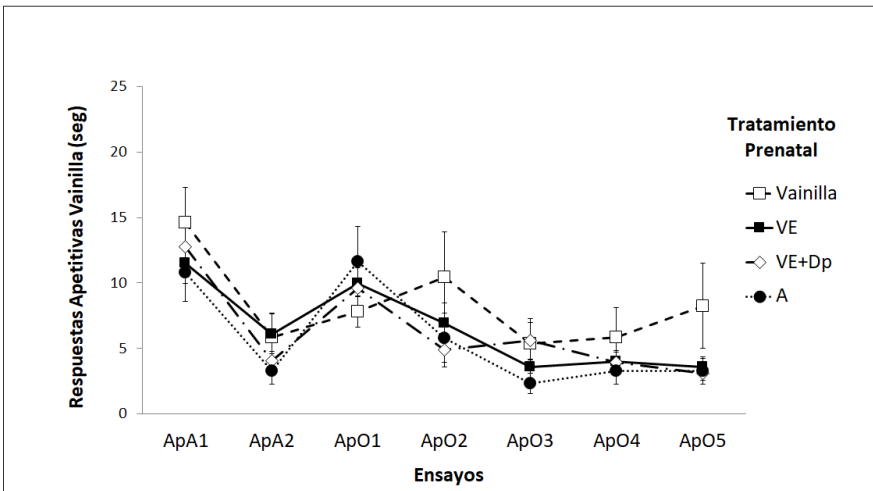


Figura 2d: Media de respuestas apetitivas a la vainilla (seg) en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Respuestas aversivas: al igual que con las respuestas apetitivas, solo se encontró un efecto significativo de la variable Ensayo $F(6, 432) = 3,50, p < 0,005$. El análisis post hoc indicó que todos los sujetos mostraron menos reacciones aversivas en el primer ensayo de agua con respecto al segundo ensayo. Asimismo, en el primer ensayo con vainilla se registraron menos reacciones aversivas que en los siguientes 4 ensayos con este sabor. Estos resultados pueden consultarse en la figura 2f, y los relativos a cada tratamiento, en la figura 2g.

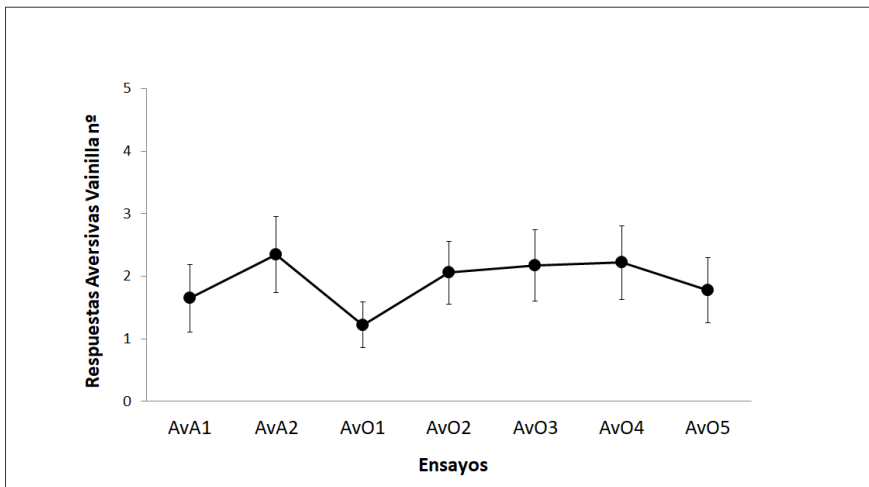


Figura 2f: Media de respuestas aversivas a la vainilla (seg) en cada ensayo. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

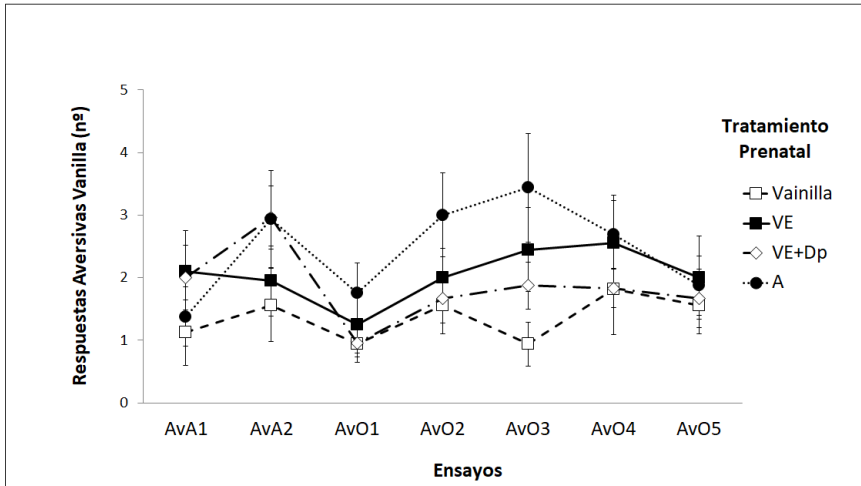


Figura 2g: Media de respuestas aversivas a la vainilla en función de los diferentes tratamientos prenatales. Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

DISCUSIÓN - CONCLUSIONES

Con respecto a los resultados de la prueba de atracción por olores al DP 1, estos muestran que la exposición prenatal de la vainilla, junto con el alcohol induce no sólo una mayor atracción por ese olor en la etapa neonatal, si no que además genera una respuesta de mayor consumo de vainilla en la etapa infantil, aunque no se observan cambios en la palatabilidad del sabor. Además, la eliminación del acetaldehído durante la exposición prenatal a la vainilla y el alcohol impidió la observación del mencionado incremento en las respuestas ante la vainilla.

Como se ha indicado previamente, todos los neonatos expuestos prenatalmente a la vainilla mostraron una atracción

por su olor cuando esta se presentó sola en la prueba. Es interesante destacar aquí que este efecto se observó también en sujetos que experimentaron su olor y sabor mezclado con el del alcohol en la etapa prenatal, y también en aquellos que recibieron el compuesto y la D-penicilamina, es decir, en ausencia de acetaldehído. Estos resultados confirman los de estudios previos mostrando que la mera exposición prenatal a un olor, en ausencia de reforzadores explícitos, genera una atracción por dichos olores, cuando se prueba poco tiempo después del nacimiento (Gaztañaga et al., 2015; 2017). Esta atracción se ha atribuido a un efecto de familiaridad que, como se ha mostrado en un gran número de estudios y se ha comentado en la introducción de esta tesis, es observable desde la ontogenia temprana e incluso desde antes del nacimiento.

Por otra parte, cuando todos los sujetos fueron evaluados con la mezcla de vainilla y alcohol, solo mostraron atracción por este compuesto los sujetos que habían experimentado ambas sustancias en el útero. La falta de atracción por el compuesto en aquellos sujetos expuestos solo a la vainilla, parece indicar que durante la prueba de atracción los neonatos no perciben ambos olores de la misma manera. Es lógico pensar que el alcohol, por su alta volatilidad, resulta más saliente en comparación con la vainilla, cuando la mezcla se presenta directamente frente al hocico del neonato. Por lo que las respuestas de atracción ante la mezcla vainilla-alcohol podrían ser interpretadas como respuestas mayormente al

olor del alcohol. Es decir, que los neonatos expuestos prenatalmente a la vainilla no serían atraídos por el compuesto por estar percibiendo principalmente el olor del alcohol, el cual ha ensombrecido el olor de la vainilla. Además, esta interpretación encuentra apoyo en la diferencia en la respuesta de atracción mostrada por ambos grupos expuestos prenatalmente al compuesto. El grupo expuesto a la mezcla alcohol-vainilla muestra una clara atracción por ambos olores cuando se presentan por separado, indicando que durante la exposición prenatal los fetos sí perciben las características quimiosensoriales de ambas sustancias. Así, estos neonatos muestran atracción por la vainilla y, cuando son evaluados ante la mezcla, estarían mostrando su atracción por el olor del alcohol. El grupo expuesto prenatalmente a la mezcla en ausencia de acetaldehído, al ser evaluado ante la vainilla también muestra una mayor atracción por este olor en la misma medida que los sujetos expuestos solo a la vainilla. Por lo que se puede deducir que, durante la experiencia prenatal, el alcohol no parece estar ensombreciendo la percepción de la vainilla cuando ambas sustancias se presentan simultáneamente. Aunque en menor medida que ante la vainilla, este mismo grupo mostró cierta atracción por el olor de la mezcla de vainilla y alcohol. Si consideramos la falta de atracción por el olor etílico observada en el Experimento 1 y en estudios previos, en los que la exposición prenatal al alcohol ocurrió en ausencia del reforzador, el resultado observado en este grupo podría indicar que, aunque en la prueba de

atracción con el olor de la mezcla, el alcohol parece estar ensombreciendo al olor de la vainilla, dicho ensombrecimiento podría no ser completo, por lo que el nivel de atracción observado es reflejo de la respuesta a la vainilla.

En resumen, los resultados de la prueba de atracción por olores de este experimento muestran que todos los sujetos expuestos prenatalmente a la vainilla, tanto sola como en compuesto con alcohol, fueron atraídos por su olor cuando fueron evaluados tras el nacimiento, en comparación con los sujetos tratados con agua. Los sujetos expuestos solo a la vainilla no mostraron atracción alguna por el olor del compuesto vainilla-alcohol. La exposición prenatal conjunta de vainilla y alcohol generó atracción tanto al olor de la vainilla como a la mezcla de ambos olores. Pero cuando esta experiencia prenatal tuvo lugar en ausencia de acetaldehído, los sujetos mostraron una clara atracción por la vainilla y en menor medida por el compuesto de vainilla y alcohol. Los sujetos sin experiencia con estas sustancias no mostraron ninguna atracción por los olores de las mismas.

Con respecto a los resultados de la prueba de consumo y de reacción al sabor en la infancia, al DP 14, se observó que los sujetos expuestos prenatalmente a la vainilla junto con el alcohol consumieron más vainilla, en comparación con sujetos expuestos solo a la vainilla, o expuestos a ambas sustancias pero en ausencia de acetaldehído, o sin experiencia alguna con estos sabores. Estos resultados parecen indicar que los sujetos expuestos a ambas sustancias en el útero asociaron el

sabor/olor de la vainilla con los efectos reforzantes del acetaldehído derivado del alcohol, es decir, adquirieron una respuesta condicionada apetitiva por la vainilla, mostrando un mayor consumo de este sabor en la infancia. Sin embargo, esto no se tradujo en una mayor palatabilidad del sabor de la vainilla por parte de estos sujetos. El hecho de que los resultados observados en la prueba de consumo no vayan acompañados de un aumento en la palatabilidad, confirma que ambas pruebas reflejan procesos diferentes (Berridge, 2000). Resultados similares han sido encontrados en estudios previos de nuestro laboratorio en los que la familiaridad con un sabor modificó de forma diferencial el consumo y la palatabilidad de dicho sabor en crías de 14 días postnatales (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010b).

Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que el valor hedónico apetitivo del alcohol se puede transferir a otros olores y sabores cuando ambos se exponen en el ambiente prenatal. Es importante destacar que es la primera vez que se muestra esta posibilidad de asociar el potencial reforzador apetitivo del alcohol a un sabor/olor no etílico, experimentado en el útero. Además, el aumento de consumo observado en respuesta a la exposición de vainilla y alcohol fue anulado por la administración prenatal de D-penicilamina, es decir, al eliminar el acetaldehído derivado del alcohol. Este resultado confirma nuestra hipótesis de que, en este aprendizaje prenatal, el reforzador apetitivo que se asocia al sabor/olor compuesto por la vainilla-alcohol (EC) es el acetaldehído

derivado de la oxidación del alcohol (Et). Asimismo, este hallazgo demuestra que la experiencia quimiosensorial prenatal se retendrá y expresará en la infancia como un aumento en el consumo, solo cuando ésta ocurra en presencia de un reforzador, en este caso, el acetaldehído.

EXPERIMENTO 3: MEDICIÓN DE ACETALDEHÍDO EN TEJIDO CEREBRAL MATERNO Y FETAL

Tal como se ha comentado, el alcohol se metaboliza por oxidación a acetaldehído y éste luego a acetato. El acetaldehído producido a nivel periférico no cruza la barrera hematoencefálica a menos que este metabolito se encuentre en concentraciones relativamente elevadas en sangre (Tabakoff, Anderson, y Ritzmann, 1976). Aunque inicialmente se descartaba que hubiera acetaldehído en cerebro por la ausencia de la enzima alcohol deshidrogenasa; en la década de los 80 se demostró que el alcohol se oxida a acetaldehído en este tejido por los sistemas enzimáticos de las catalasas y el microsomal CYP2E1 (Aragón et al., 1992; Zimatkin et al., 2006). Estos resultados fueron los que apoyaron en primer lugar la idea de que los metabolitos del alcohol podrían jugar un papel en los cambios del comportamiento tras la intoxicación etílica (Deng y Deitrich, 2008).

Además de los ya mencionados enfoques experimentales para estudiar si los niveles de acetaldehído en el cerebro modifican el comportamiento, en un buen número de estudios se utilizaron medidas indirectas, como la manipulación de las enzimas oxidantes del alcohol y del acetaldehído, para evaluar el papel de este metabolito del alcohol (Zalman Amit, Smith, y Weiss, 1999; Aragón et al., 1985; Eriksson, 1985; Redila, Smith, y Amit, 2000; Zimatkin et al., 2006). Sin embargo, es notable la escasez de estudios en los

que se consigue medir de manera exitosa y fiable los niveles de acetaldehído en el cerebro tras el consumo de alcohol. Son varios los factores que dificultan la medición directa de las concentraciones de este metabolito en tejidos animales; como las bajas concentraciones, la alta volatilidad, el rápido metabolismo de la ALDH y la formación artefactual de acetaldehído durante el procesamiento de las muestras de tejido (Eriksson, Hillbom, y Sovijärvi, 1979; Eriksson, Saarenmaa, Bykov, y Heino, 2007). Todos estos trabajos han sido realizados con animales adultos y solo hay un trabajo en el que se ha podido detectar directamente el acetaldehído en el cerebro del feto (Mao et al., 2013). Pero, tal como se ha comentado anteriormente, hay varios estudios en los que se ha inferido la presencia de acetaldehído en estos tejidos por medios indirectos, por ejemplo la medición de la cantidad de enzimas catalasas presentes en cerebro fetal (Hamby-Mason et al., 1997).

Para cuantificar de forma fiable compuestos altamente volátiles, como el acetaldehído, los métodos deben estar claramente validados. Una de las publicaciones más recientes presenta una técnica para medir este metabolito en cerebro utilizando cromatografía de gases "head-space" y espectrometría de masas (GC-MS) (Heit et al., 2016).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo de este experimento es detectar y cuantificar el acetaldehído y el alcohol en el tejido cerebral materno y de sus fetos al DG 20, tras la administración i.g. de alcohol o agua a las madres. Para ello se utilizó la técnica descrita en el estudio de Heit y colaboradores (2016). Se espera detectar alcohol y acetaldehído únicamente en el tejido cerebral de los sujetos expuestos al alcohol (madres y fetos).

MÉTODO

Sujetos

Se emplearon 5 hembras preñadas y sus camadas y fueron distribuidas en un grupo de calibrado, dos experimentales (alcohol) y dos controles (agua).

Procedimiento

El trabajo con los animales, la obtención y procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de la Facultad de Psicología de la UPV en Donostia-San Sebastián. Se siguió de forma estricta y detallada el procedimiento descrito en el trabajo de Heit y colaboradores (2016). El desarrollo del método, su aplicación y el análisis de las muestras fue realizado en el Servicio Central de Análisis de la UPV/EHU en el Centro de Investigación Lascaray en Vitoria-Gasteiz bajo la supervisión de Mamen Sampedro.

Tratamiento Prenatal

Al DG 20, un grupo de hembras gestantes recibió una administración i.g. de alcohol (2g/kg) y el otro grupo, una administración i.g. de agua.

Obtención de las muestras

Una hora después de la administración de las madres, estas fueron sacrificadas para obtener sus cerebros. Del mismo modo se les practicó una laparotomía para extraer los fetos. Estos a su vez, eran extraídos y sacrificados en el momento para la obtención del cerebro. Se decidió realizar la extracción de estos tejidos 60 minutos tras la administración de alcohol en base al único estudio en el que se detectó exitosamente acetaldehído en tejido cerebral fetal (Mao et al., 2013).

Procesamiento de las muestras

Las muestras obtenidas fueron procesadas en el mismo momento de la extracción mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, las muestras eran pesadas y posteriormente envueltas en papel de aluminio para ser congeladas sumergiéndose en nitrógeno líquido. Luego la muestra era pulverizada mecánicamente y el polvo resultante se introducía en viales de plástico. A esto, se le añadía un mililitro de una solución de ácido perclórico (PCA) y thiourea (50 ml de PCA 1,7 M + thiourea 40 mM) y posteriormente el contenido del vial era agitado. Para finalizar, se introducía el vial en una centrífuga a 16,06 g (13000 rpm) durante cinco minutos a 4 grados. Una vez terminada la centrífuga, se

tomaban 300 μL de sobrenadante y se pasaban a otro vial de 20 ml específico para Head Space. Este último paso se realiza por duplicado para cada muestra, es decir, dos viales con 300 μL cada uno. Finalmente, las muestras fueron conservadas en congelador (-20o? -80o?)

Medición por GC-MS – (Condiciones cromatográficas y del espectrómetro de masas)

Columnas: para la detección de alcohol y acetaldehído se empleó una columna CP-Sil 5 CB 30 x 0.32 (3 μm) y helio como gas portador. El modo de inyección fue Split (10:1) estableciendo una temperatura de 200°C para el inyector. El flujo fue de 1,5ml/min y el gradiente de temperatura fue el siguiente: 35°C (3.5 min) a 75°C/min hasta 240°C (3 min). La temperatura interfase fue de 250°C y el tiempo de elución para compuesto fue de 1,88 min para el acetaldehído y de 2,65 min para el alcohol. Los demás parámetros fueron similares a los descritos en el artículo en el que nos basamos (Heit et al., 2016).

Límite de cuantificación, repetitividad y calibración

Los límites de cuantificación del método fueron estimados inyectando concentraciones decrecientes de ambos analitos del objeto de estudio (ACH y alcohol) en patrones en agua y matriz de cerebro. En ambos casos, se estableció 1,1 μM como la concentración mínima cuantificable en patrones, con una RSD inferior o igual al 8%.

Por otro lado también se estudió la repetitividad inyectando tres muestras idénticas con concentraciones del límite de cuantificación (1,13 μM), otras tres con un nivel intermedio (11,3 μM) y tres más con un nivel alto (113 μM). Las RSD obtenidas fueron de 7,8%, 3,3% y 1,1% en cada nivel para el acetaldehído, y en el caso del alcohol fueron de 4,6%, 2,2% y 1,6%.

Estudio de matriz en cerebro

Para el estudio de la linealidad y la cuantificación, se prepararon matrices en cerebro de rata con diferentes concentraciones, comprendidas entre 0,45 y 113 μM . Las muestras tomadas fueron de 0.16mg de cerebro y a todas se les aplicó un patrón interno de acetaldehído deuterado (ACH-D4). Con el acetaldehído se observó que empleando matriz, el ión m/z 29 no se podía cuantificar por debajo de 50 μM con los extractos de cerebro, sin embargo, empleando el m/z 43 se lograba mayor sensibilidad. Los límites de cuantificación establecidos fueron de 2,5 μM para los dos compuestos. Para la calibración, se propuso un intervalo de concentración entre 2,5-113 μM de acetaldehído y entre 2,4-10868 μM de alcohol en muestra de cerebro. Las curvas de calibración fueron calculadas del mismo modo que el estudio de patrones, obteniendo en ambos casos coeficientes de correlación superiores al 0.996. Se empleó también una muestra control en cerebro fortificado con una concentración de 113 μM de acetaldehído y 109 μM de alcohol. Se analizó dicha muestra a ciegas, pretendiendo ser una muestra experimental. La

recuperación de cada analito varió entre el 84 y 104% respectivamente. Dicho resultado cumple con los criterios establecidos (80-120%) en las guías de validación para métodos bioanalíticos.

Además de lo anterior, se realizaron una serie de comprobaciones. Por un lado, se hicieron pruebas para comprobar la estabilidad de las muestras cuando eran guardadas en nevera. Esto se realizó porque el trabajo se realizó en dos laboratorios distantes y las muestras debían ser conservadas y posteriormente trasladadas. Al pasar cierta cantidad de horas entre la extracción de la muestra y la realización del análisis, convenía comprobar la pérdida tanto del alcohol como de acetaldehído de las muestras. Mediante estas pruebas se pudo comprobar que existía una pérdida de ambos analitos tras dos días en nevera y su traslado.

Prueba de Límites de cuantificación: se realizó para comprobar límites de cuantificación en muestra y para realizar comparaciones entre muestras con diferentes cantidades de analito. Se hizo una prueba a tres niveles diferentes de concentración, pudiendo observarse que entre el primer y el último nivel de concentración, la recuperación de analito de una muestra era casi de la tercera parte. Con la obtención de este dato, se estableció el límite de cuantificación en patrones, que correspondió con 1,13 μM , ya que las réplicas realizadas tuvieron una desviación estándar relativa (RSD) de las áreas inferior al 20 % y es reproducible a los tres niveles de concentración.

Análisis de datos:

En base a los patrones generados, se realizaron comparaciones de las medidas en μM obtenidas en el cromatógrafo.

Se realizó un ANOVA factorial con las variables independientes Tratamiento prenatal (Agua, Etanol), Tipo de muestra (Feto, Madre) y la variable dependiente $\mu\text{molEtanol/g}$.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos señalan que no se detectó acetaldehído en ninguna de las muestras analizadas. Por lo que se deduce que, de haber acetaldehído en alguna muestra, en ninguno de los casos se superó el umbral de detección.

En el caso del alcohol, El ANOVA realizado encontró un efecto significativo de la variable Tratamiento prenatal $F(1, 47) = 103,94$; $p < 0.0001$, de la variable Tipo de muestra $F(1, 47) = 30,36$; $p < 0.0001$ y de la interacción entre ambas variables $F(1, 47) = 30,36$; $p < 0.0001$. Como era de esperar, sólo se detectó esta sustancia en las muestras de sujetos tratados con alcohol (madres y fetos), mientras que en las muestras de los sujetos controles que habían recibido agua, la detección fue negativa. Además, se detectaron cantidades significativamente superiores de alcohol en las muestras de cerebro fetal que en las de sus correspondientes madres $p < 0.0001$.

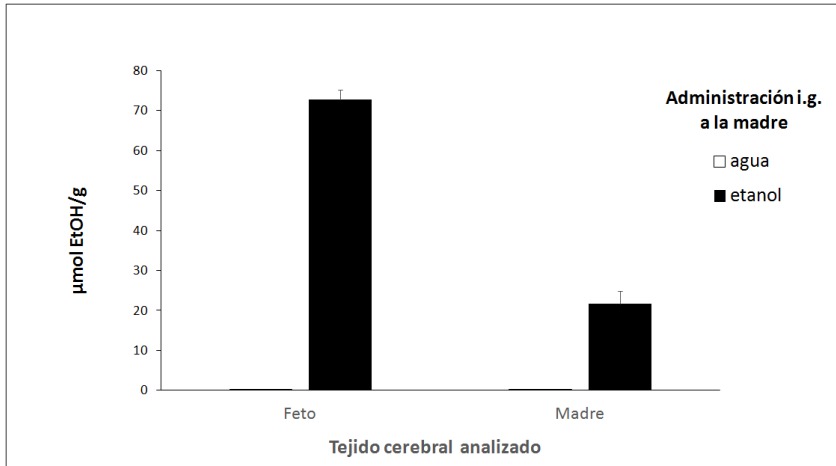


Figura 3: μM de alcohol por gramo obtenidas en las muestras de tejido cerebral materno y fetal en función de la administración i.g. de agua o alcohol a la madre gestante al DG 20.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La falta de detección del acetaldehído en las muestras de tejido cerebral materno y fetal puede deberse a diferentes razones. Una de ellas es que las muestras fueron tomadas a partir de cerebro completo homogeneizado, en lugar de estructuras cerebrales concretas en las que el acetaldehído se produciría en mayor medida (por mayor concentración de catalasas) y por lo tanto las muestras de solo ese tejido contendrían mayor concentración del metabolito del alcohol (Moreno, Mugnaini, y Cerú, 1995; Zimatkin y Lindros, 1996; Sanchis y colaboradores, 2005).

Otra posible causa es el lapso transcurrido entre la extracción de las muestras y su análisis (la extracción se hacía

por la tarde en un laboratorio y el análisis a la mañana siguiente en otro laboratorio). Como se ha descrito, por ese intervalo de tiempo, por el traslado y el inevitable cambio en las condiciones de conservación, no se descarta cierta pérdida de las sustancias a medir, tanto alcohol como su metabolito. Al ser el acetaldehído más volátil y encontrarse en menores concentraciones que el alcohol, lógicamente se puede inferir que esta pérdida afectó en mayor medida a los niveles detectables de acetaldehído, ya que el alcohol se consiguió detectar. Por último, la técnica seleccionada para detectar el acetaldehído tal vez no es la más sensible para detectar las cantidades tan reducidas de acetaldehído que se encuentran en este tejido. De hecho, en el único estudio en el que se detectó acetaldehído en cerebro fetal utilizaron otra técnica, cromatografía líquida. Por lo que en futuros experimentos con el objetivo de detectar y medir este metabolito del alcohol, se deberán tener en cuenta todos estos factores mencionados.

De todos modos, los resultados obtenidos en la medición de alcohol en el tejido cerebral han confirmado lo que se ha reportado en estudios previos. Esto es, que a los 60 minutos después de la administración i.g. de alcohol a la madre gestante, la concentración de alcohol en los tejidos fetales/líquido amniótico es mayor que en los de la madre (Guerra y Sanchis, 1985; Nava-Ocampo et al., 2004). Este dato junto con los resultados de estudios que indican que la cantidad de catalasas en cerebro fetal es superior a la de los adultos (Hamby-Mason, 1997), nos permite deducir que el

acetaldehído está presente en el cerebro fetal cuando la madre ingiere alcohol.

EXPERIMENTO 4: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A UN ESTÍMULO QUIMIOSENSORIAL SOBRE SU CONDICIONAMIENTO EN LA INFANCIA

Como se observó en el experimento 2, los sujetos expuestos prenatalmente a la vainilla en ausencia de reforzamiento (Grupo V), no modificaron su respuesta ante este olor en la etapa infantil, ni en la prueba de consumo ni en la de reacción al sabor. Tal como se ha comentado anteriormente, este resultado ha sido descrito previamente en estudios de este y otros laboratorios (Gaztañaga et al., 2015).

Esta ausencia de respuesta ha sido generalmente interpretada como un problema de retención de la memoria prenatal en relación al sabor experimentado en el útero. Sin embargo, cabría la posibilidad que no se tratara de un problema de retención sino más bien de expresión. Es decir, que tal vez este cambio en la respuesta no se detecta fácilmente de forma directa con ese tipo de pruebas, pero en cambio si se puede detectar de forma indirecta a través de otros indicadores. Por ejemplo, una forma de evaluar la retención de la memoria prenatal es a través de su potencial interferencia con aprendizajes postnatales en las que participe ese mismo olor/sabor como EC. En base a los resultados de estudios previos en los que se analizaron los efectos de la preexposición a estímulos sobre el condicionamiento en crías de rata, esta interferencia puede ser tanto una facilitación

como en un retraso del aprendizaje --inhibición latente-- (Chotro y Alonso, 1999, 2001; Gaztañaga et al., 2015).

OBJETIVOS Y HIPÓTESIS

El objetivo de este experimento es el de investigar si la exposición prenatal a la vainilla, tanto sola como en compañía de un reforzador, interfiere en el condicionamiento de este sabor en la infancia de la rata. Para asegurar que haya margen para observar un cambio en el condicionamiento postnatal (facilitación o retraso), se empleó un El aversivo relativamente débil (LiCl 0,15M). Además, la intensidad de este El responde a las recomendaciones del comité de ética para la experimentación con crías de rata.

En base a estudios previos, se plantearon las siguientes hipótesis: 1) que la exposición prenatal a la vainilla junto con el alcohol, al inducir una preferencia condicionada prenatal, impedirá o retrasará la adquisición postnatal de una aversión condicionada por el sabor de la vainilla (contracondicionamiento) y 2) que la exposición prenatal solo a la vainilla inducirá una facilitación del condicionamiento postnatal.

MÉTODO

Sujetos

Se emplearon un total de 60 crías provenientes de 15 camadas.

Procedimiento

Tratamiento Prenatal:

Cada mañana de los DG 17 a 20, las hembras gestantes recibieron una administración i.g. de la sustancia correspondiente: agua, vainilla o vainilla junto con alcohol.

Condicionamiento y evaluación postnatal de las crías:

Esta fase consistió en dos días de condicionamiento (DP 12 y DP 13) seguidos de una prueba al DP 14. En las dos sesiones de condicionamiento las crías recibieron la infusión intraoral de vainilla (EC) seguida inmediatamente por una inyección i.p. de la sustancia correspondiente a su grupo experimental (salina o LiCl). En la prueba, se evaluó el consumo de vainilla de todas las crías.

Diseño experimental:

En base a los tres Tratamientos prenatales (agua, A, vainilla, V o vainilla + alcohol, VE) y la sustancia administrada durante el condicionamiento (salina, NC o LiCl, C), en total hubo 6 grupos experimentales (ver tabla 3).

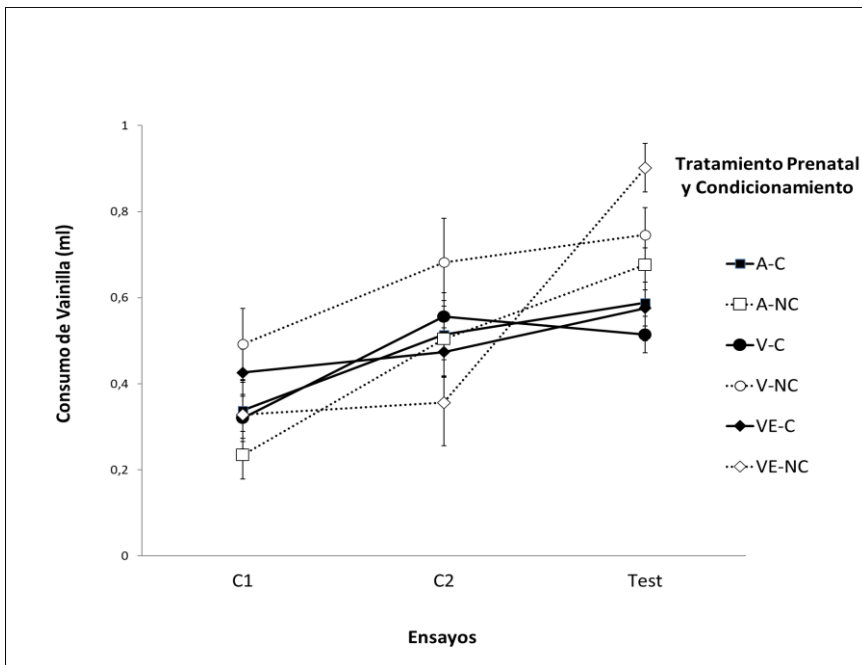
		Condicionamiento	
		No- condicionado (NC)	Condicionado (C)
Tratamiento prenatal	agua (A)	A-NC (n=10)	A-C (n=10)
	vainilla (V)	V-NC(n=10)	V-C (n=10)
	vainilla + alcohol (VE)	VE-NC (n=10)	VE-C (n=10)

Análisis de datos:

Los datos de consumo fueron analizados primero con un ANOVA general de medidas repetidas con las variables independientes Tratamiento prenatal y Condicionamiento, y como medida repetida el consumo de vainilla durante los tres días (2 ensayos de condicionamiento y la prueba). Como variable dependiente, los ml de vainilla consumidos por cada sujeto. También se analizó el consumo de vainilla con ANOVAs factoriales para cada día. Las interacciones entre variables fueron analizadas con la prueba post hoc de Duncan. También se realizaron comparaciones planeadas entre los grupos de interés (prueba de Fisher).

RESULTADOS

El ANOVA con los datos de los 6 grupos durante los 3 ensayos indicó un efecto significativo de la variable Ensayo, $F(2,108)= 27,55$, $p < 0,001$. El análisis de este efecto indica que todos los grupos incrementaron significativamente su consumo de un día al otro. Este efecto se explica por el desarrollo de los sujetos que al aumentar su tamaño también



aumenta su capacidad de consumo de líquidos.

Figura 4: Media del consumo en ml de vainilla en función del tratamiento prenatal (A, V o VE) y del condicionamiento postnatal (C y NC). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Además, el ANOVA indicó interacciones del Tratamiento prenatal x Ensayo, $F(4,108)= 2,64$, $p < 0,05$ y de Condicionamiento x Ensayo, $F(2,108)= 4,64$, $p < 0,05$. El análisis de estas interacciones mostró por un lado que el grupo con tratamiento prenatal VE, independientemente del condicionamiento, consumió menos vainilla que el grupo V en el segundo ensayo, y por otro, que independientemente del tratamiento prenatal, los grupos condicionados consumieron significativamente menos vainilla que los no condicionados el día de la Prueba.

En base a los objetivos e hipótesis de este estudio, se hicieron comparaciones planeadas entre los principales grupos de interés el día de la Prueba. Así, se observó que en la Prueba no hubo diferencias en el consumo entre los grupos A-C y A-NC $F(1, 54)= 0,68$, $p= 0,41$, mientras que el grupo V-C consumió menos vainilla que su control V-NC $F(1, 54)= 4,71$, $p < 0,05$ y el grupo VE-C consumió menos que el grupo VE-NC $F(1, 54)= 9,30$, $p < 0,01$. Es decir, que los sujetos expuestos prenatalmente al agua no adquirieron una aversión condicionada hacia la vainilla, mientras que los sujetos expuestos a este sabor, tanto solo como junto con el alcohol, mostraron una aversión condicionada después de 2 ensayos de condicionamiento.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento apoyan solo en parte las hipótesis planteadas, que la exposición prenatal a la vainilla facilita el condicionamiento postnatal de este sabor. Sin embargo, no se observó el retraso en el condicionamiento esperado en el caso de los sujetos expuestos a la vainilla junto con el alcohol, es decir aquellos sujetos que supuestamente adquirieron una preferencia condicionada prenatal (como en el Experimento 2).

Otro resultado inesperado fue el de la falta de aversión condicionada en los sujetos sin exposición prenatal a la vainilla. Esta falta de condicionamiento en el grupo expuesto prenatalmente al agua, aunque inesperado, no es demasiado sorprendente. En la literatura científica relacionada con el aprendizaje asociativo en crías ha sido demostrado que éstas presentan más dificultades para adquirir un condicionamiento aversivo que los sujetos adultos y muchas veces, para llegar al mismo nivel de condicionamiento, con las crías se necesita más ensayos de condicionamiento o un EI más intenso (Alonso y Chotro, 2004). De hecho, este déficit se ha descrito principalmente en estudios en los que se ha usado un EI de baja intensidad (Arias y Chotro, 2006; Gaztañaga, et al., 2015); por lo que se podría especular que estos sujetos hubieran mostrado una aversión hacia la vainilla de haberse incluido más ensayos de condicionamiento o si se hubiese usado una concentración mayor de LiCl. Tal como se comentó anteriormente, la razón para no incluir una dosis mayor de LiCl

(0,3 M), tal como se utiliza en adultos, está relacionada con las recomendaciones para el bienestar de los animales.

El hecho de que se observe este condicionamiento en los grupos expuestos a la vainilla indica claramente que la experiencia prenatal con este sabor facilitó el condicionamiento aversivo del mismo. Este resultado coincide con el de estudios previos en los que se encontró en crías de rata de similar edad a las usadas en este estudio, una facilitación de la aversión condicionada al sabor por la preexposición a los sabores a ser condicionados (Chotro y Alonso, 1999, 2001, 2003). Hay que destacar que este efecto de facilitación se reportó en aquellos casos en los que no se observaba condicionamiento o cuando la respuesta condicionada era débil (Gaztañaga et al., 2014; Hoffmann y Spear, 1989). La facilitación de la aversión condicionada al sabor por preexposición al EC se ha descrito fundamentalmente en crías, ya que con adultos la preexposición produce inhibición latente. Sin embargo, en un estudio con ratas adultas se encontró que la preexposición al EC producía una facilitación de una preferencia condicionada cuando el EC inicialmente no era apetecible (Morillas, Gonzalez y Hall, 2018). También en otro estudio se describió una facilitación de la aversión condicionada en ratas adultas (Bennett, Tremain, y Mackintosh, 1996). En ese estudio, el efecto beneficioso de la preexposición se observó cuando el EC era un estímulo complejo y se presentó durante un periodo relativamente breve durante el condicionamiento, lo que

ayudó a su completo procesamiento y por ende a su condicionamiento. En el caso de las crías, se piensa que la preexposición al EC facilita el condicionamiento, ya sea por su inmadurez sensorial o por las estrategias de procesamiento diferentes a las de los adultos (configural vs. elemental) (Alonso y Chotro, 2004; Gaztañaga et al., 2014).

En el caso de la exposición prenatal a la vainilla junto con el alcohol, la hipótesis planteada era que, al haber adquirido una preferencia condicionada prenatal a la vainilla, esta iba a competir o interferir con la adquisición de una aversión al mismo sabor. Sin embargo no se observó un retraso en el condicionamiento si no el resultado opuesto, una facilitación de la aversión a la vainilla. El hecho de que en este caso no se haya manifestado el mayor consumo de vainilla por su exposición prenatal junto con el alcohol se puede explicar por dos razones. La primera es que la evaluación del consumo de vainilla se realizó por primera vez al DP 12, cuando las crías no tienen aún bien desarrollada su capacidad de regular (tragar o rechazar) el consumo de sustancias infundidas intraoralmente, cuando no interviene la succión (Kozlov, Petrov, Kashinsky, Nizhnikov, y Spear, 2003). Generalmente las pruebas de consumo en la infancia se realizan a partir del DP 14. En este estudio, sin embargo, al DP 14 el consumo de las crías expuestas prenatalmente a la vainilla y el alcohol fue relativamente elevado y similar en magnitud a lo observado en la prueba del experimento 2. Sin embargo, no es posible comparar este consumo con el de los controles, en las mismas

condiciones que en el experimento anterior, ya que estos han tenido dos exposiciones previas a la vainilla y su consumo al DP 14 es relativamente más elevado por un esperable efecto de familiaridad o habituación a la neofobia. No obstante, la facilitación del condicionamiento observada en este grupo es similar a la obtenida en el grupo expuesto prenatalmente solo a la vainilla. Este resultado concuerda con el de los estudios antes citados y apoya la explicación de los mismos: mientras no haya un condicionamiento completo, la preexposición al EC solo facilitará la adquisición del aprendizaje (Chotro y Alonso, 2001). Es decir, que en crías de rata no se observará el efecto de inhibición latente --o de contracondicionamiento--- mientras haya un correcto procesamiento del EC y como consecuencia la completa adquisición de una respuesta condicionada.

EXPERIMENTO 5: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ALCOHOL SOBRE SU CAPACIDAD PARA ACTUAR COMO ESTÍMULO INCONDICIONADO EN LA INFANCIA

En varios paradigmas de condicionamiento clásico o Pavloviano, se ha demostrado un retraso del aprendizaje por la exposición previa a alguno de los estímulos que participan en el condicionamiento. Por un lado, la preexposición al EC induce inhibición latente, que se manifiesta como un retraso del condicionamiento, y algo similar ocurre con el "efecto de preexposición al EI". Este último efecto se ha demostrado principalmente en preparaciones de aversión al sabor en ratas adultas (Randich y LoLordo, 1979). Aunque también existen unos pocos trabajos con crías de rata en los que se ha encontrado efecto de preexposición al EI (Stefania Castello, Bobbio, Orellana, y Arias, 2012; Reville, Arias, y Spear, 2013). Una explicación de este efecto es que durante la preexposición ocurre una asociación entre el EI y el contexto, asociación que interfiere en una nueva asociación a través del fenómeno del "bloqueo", impidiendo que ese mismo EI se asocie con otro EC, cuando estos estímulos se presentan en el contexto original. Esta hipótesis del bloqueo contextual, explicando el efecto de preexposición al EI en la aversión condicionada al sabor, ha obtenido apoyo empírico en ratas adultas (Riley y Simpson, 2001). Sin embargo, existen otros estudios realizados con crías de rata, cuyos resultados no apoyan la explicación del bloqueo contextual y que aportan explicaciones alternativas

relacionadas con fenómenos de aprendizaje no asociativo, tal como tolerancia y la habituación al EI (Stefania Castello et al., 2012; Reville et al., 2013).

En todos estos trabajos mencionados en el párrafo anterior, se utilizó el LiCl como EI. Pero también hay algunos estudios en los que se ha encontrado que la preexposición al alcohol en ratas adultas puede atenuar los efectos aversivos del alcohol en una aversión condicionada al sabor inducida por esta droga (Barker y Johns, 1978; Berman y Cannon, 1974; Diaz-Granados y Graham, 2007; Sherrill, Berthold, Koss, Juraska, y Gully, 2011). En algunos de estos trabajos se atribuyó esta atenuación al efecto de preexposición al EI, mientras que en otros a varios efectos neuroquímicos del alcohol.

En cuanto a la ontogenia temprana, no existen trabajos que estudien explícitamente el efecto de preexposición al EI con alcohol. Pero hay datos de estudios con exposición prenatal al alcohol y condicionamiento postnatal con el alcohol como reforzador. En uno de ellos se encontró que la exposición prenatal al alcohol generaba una sensibilización a las propiedades reforzantes apetitivas de la droga, induciendo un aumento en la respuesta condicionada a un pezón artificial, tras haber sido emparejado con dosis bajas de esta droga (Nizhnikov, Molina, Varlinskaya, y Spear, 2006). Sin embargo, por las dosis relativamente bajas empleadas, en dicho estudio no se pudo comprobar si la exposición prenatal al alcohol modificaba su capacidad de actuar como EI aversivo. Por el contrario, en otros dos trabajos se encontró que la exposición

prenatal al alcohol atenuaba la respuesta de aversión condicionada, facilitando la extinción de la misma, cuando el alcohol actuaba tanto como EC como EI (Arias y Chotro, 2006; Chotro et al., 2009). En estos últimos dos trabajos, la aversión se generaba con la administración intragástrica de una dosis relativamente alta de alcohol (3 g/kg) a las crías en el DP 10. Este procedimiento ha sido demostrado que induce una aversión al sabor y olor del alcohol, tras asociación de las claves quimiosensoriales etílicas (el EC), a través de la fracción no metabolizada del alcohol eliminada por vía respiratoria, con sus efectos farmacológicos aversivos (el EI). Esta asociación resulta en una aversión condicionada al sabor y olor del alcohol tras solo un ensayo de intoxicación (Molina, Chotro, y Spear, 1989). Sin embargo, de estos resultados no se puede discernir si la mencionada atenuación de la respuesta condicionada postnatal al alcohol, por su exposición prenatal, se debe a un efecto de inhibición latente por la exposición prenatal al sabor del alcohol (EC) o a un efecto de preexposición al EI, o a la suma de ambos efectos de preexposición. En otras palabras, de esos estudios no se puede inferir que la exposición prenatal al alcohol altera las propiedades reforzantes del mismo, y por ende su capacidad de actuar como EI en una aversión condicionada al sabor. Considerando que en el estudio de Nizhnikov et al (2006) la exposición prenatal indujo una sensibilización a los efectos incondicionales de dosis bajas de alcohol, mientras que en los siguientes dos estudios mencionados, se observó una

atenuación del condicionamiento usando dosis elevadas de alcohol, en el presente experimento se propuso analizar en conjunto estos resultados, aparentemente contradictorios.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo del presente experimento fue investigar si la exposición prenatal al alcohol modifica su capacidad de actuar en la infancia como El aversivo, al ser emparejado postnatalmente con un sabor no etílico (sacarina); y si este resultado es dependiente de la intensidad de la dosis de alcohol empleada.

La hipótesis de trabajo es que la exposición prenatal al alcohol reducirá la capacidad de esta droga de actuar como El aversivo cuando se usa una dosis relativamente alta en el condicionamiento (3 g/kg). Así, en los sujetos que han tenido una exposición prenatal al El, el condicionamiento del EC se verá retrasado o atenuado cuando se empareje con un El de alta intensidad, es decir una dosis aversiva de alcohol (3 g/kg), en comparación con el grupo que no ha tenido experiencia previa con el El. Por otra parte, en base a los resultados mencionados anteriormente, se espera que los sujetos expuestos prenatalmente al alcohol muestren una sensibilización a sus efectos aversivos con dosis relativamente bajas (El de baja intensidad). Es decir, que muestren una mayor respuesta condicionada cuando se usa una dosis relativamente baja de alcohol (1 g/kg), en comparación con los

sujetos expuestos prenatalmente al agua. En otras palabras, con una dosis alta de alcohol se condicionarán mejor los sujetos sin experiencia prenatal con la droga, mientras que con una dosis baja, se condicionarán más fácilmente aquellos sujetos sensibilizados a los efectos del alcohol por su exposición prenatal con alcohol.

MÉTODO

Sujetos

Se emplearon un total de 52 crías provenientes de 8 camadas. Teniendo en cuenta los tratamientos prenatales (administración de agua o alcohol) y el EI utilizado durante el condicionamiento (salina, alcohol 1 g/kg, o alcohol 3 g/kg), en total hubo 6 grupos experimentales (ver tabla 3).

		Condicionamiento		
		sacarina + salina (Sal)	sacarina + alcohol 1 g/kg (E1)	sacarina + alcohol 3 g/kg (E3)
Tratamiento prenatal	agua (A)	A-Sal (n=8)	A-E1 (n=8)	A-E3 (n=8)
	alcohol (E)	E-Sal (n=8)	E-E1 (n=10)	E-E3 (n=10)

Procedimiento

Tratamiento Prenatal:

Cada mañana de los DG 17 a 20, las hembras gestantes recibieron una administración i.g. de la sustancia correspondiente: agua o alcohol.

Condicionamiento y evaluación postnatal de las crías:

La evaluación postnatal consistió en dos sesiones de condicionamiento (DP 14 y DP 15) y una prueba (DP 16). En las sesiones de condicionamiento las crías recibieron la infusión intraoral de sacarina (EC) seguida inmediatamente después por una inyección i.p. del EI correspondiente a su grupo experimental (salina, 1 g/kg de alcohol, o 3 g/kg de alcohol). En la prueba, se evaluó el consumo de sacarina de todas las crías.

Análisis de datos:

Los datos de consumo fueron analizados primero con un ANOVA general de medidas repetidas con las variables independientes Tratamiento prenatal y Condicionamiento, y como medida repetida el consumo de sacarina durante los tres días (2 ensayos de condicionamiento y la prueba). Como variable dependiente, los ml de sacarina consumidos por cada sujeto. También se analizó el consumo de sacarina con ANOVAs factoriales para cada día. Las interacciones positivas entre variables fueron analizadas con la prueba post hoc de

Duncan. También se realizaron comparaciones planeadas entre los grupos de interés (prueba de Fisher).

RESULTADOS

Como se puede ver en el gráfico 5a, las crías con exposición prenatal al agua mostraron una clara aversión a la sacarina tras solo un ensayo de condicionamiento con ambas dosis de alcohol, es decir, independientemente de la intensidad del EI.

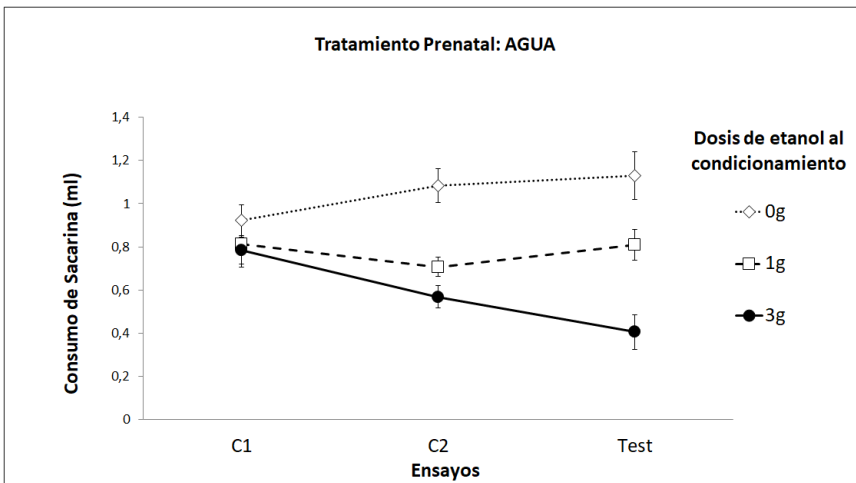


Figura 5a: Media del consumo en ml de sacarina del grupo prenatalmente tratado con agua en función del condicionamiento postnatal (0 g/kg; 1 g/kg; 3g/kg de etanol). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Por otra parte, tal como se aprecia en el gráfico 5b, el grupo de crías expuestas prenatalmente al alcohol mostró aversión hacia la sacarina tras un ensayo de condicionamiento

con el EI de más intensidad (3 g/kg). Sin embargo, cuando se usó el EI de menor intensidad (1 g/kg) no se observó una aversión ni con uno ni con dos ensayos de condicionamiento.

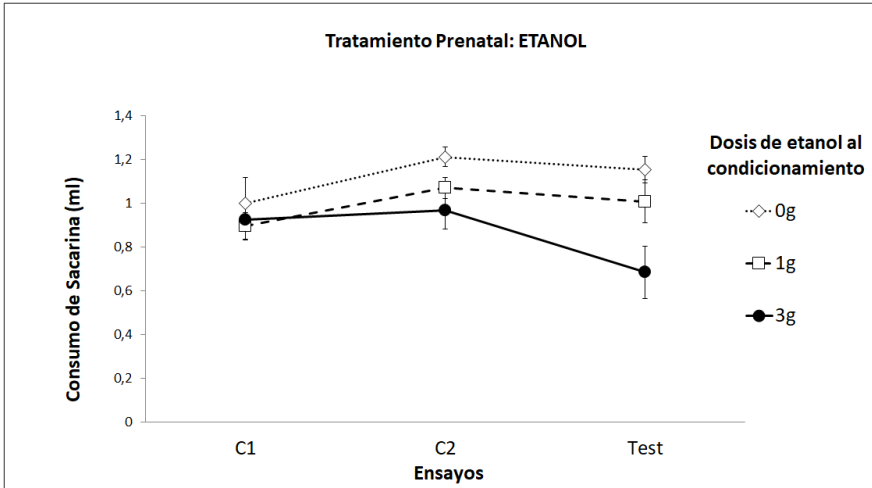


Figura 5b: Media del consumo en ml de sacarina del grupo prenatalmente tratado con etanol en función del condicionamiento postnatal (0 g/kg; 1 g/kg; 3g/kg de etanol). Las líneas verticales representan el error estándar de la media.

Esta interpretación descriptiva de los resultados se ve respaldada por los resultados de los diferentes análisis de datos. Así, el ANOVA general indicó un efecto significativo de las variables Tratamiento Prenatal $F(1,46)= 14,72$, $p < 0,001$ y Condicionamiento ($F(2,46)= 17,95$, $p < 0,001$, así como la interacción Condicionamiento x Ensayo $F(4,92)= 6,61$ $p < 0,001$. Para analizar esta interacción se realizaron ANOVAs separados para cada Ensayo. Estos indicaron que, mientras el consumo de sacarina durante el primer ensayo no difirió entre los

diferentes grupos, si se vieron diferencias al segundo ensayo de condicionamiento y en la Prueba.

Durante el segundo ensayo (C2) se observaron efectos significativos de la variable Condicionamiento $F(2,52)= 19,83$, $p < 0,0001$, y Tratamiento prenatal $F(1,52)= 28,44$, $p < 0,0001$, así como la interacción entre ambas variables $F(2,52)= 3,73$, $p < 0,05$. Por último el análisis del consumo de sacarina el día de la Prueba indicó un efecto significativo de Tratamiento prenatal $F(1,46)= 4,50$, $p < 0,05$ y Condicionamiento $F(2,46)= 19,16$, $p < 0,001$, pero no hubo interacción entre ambos factores. Las pruebas posthoc revelaron que en el ensayo C2, es decir tras un condicionamiento, dentro del grupo expuesto prenatalmente al agua, los sujetos condicionados tanto con la dosis de 1 g/kg (A-E1) como con la de 3 g/kg (A-E3) consumieron significativamente menos sacarina que el grupo control no condicionado (A-Sal), aunque ambos grupos condicionados no difirieron entre sí (A-E1 y A-E3). Es decir, que con este tratamiento prenatal se observó una aversión condicionada tras solo un ensayo con ambas dosis de alcohol. Por otra parte, entre los sujetos con tratamiento prenatal al alcohol, solo los condicionados con la dosis mayor (E-E3) consumieron significativamente menos que los controles no condicionados (E-Sal), y el consumo de los condicionados con la dosis menor no difirió ni de uno ni de otro. Cuando se comparó entre tratamientos prenatales, las pruebas post hoc revelaron una mayor aversión a la sacarina en el grupo expuesto prenatalmente al agua. Es decir, el grupo A-E1

consumió menos sacarina que el E-E1 y, sobre todo el grupo A-E3 consumió significativamente menos sacarina que el grupo E-E3. Estos resultados se pueden interpretar como una atenuación de la aversión condicionada tras un ensayo de intoxicación con alcohol, por la exposición prenatal a los efectos incondicionados de la droga.

El análisis de los datos de la Prueba, tras dos ensayos de condicionamiento, indicaron un efecto significativo del Tratamiento prenatal $F(1,46)= 4,50$, $p < 0,05$ y del Condicionamiento $F(2,46)= 19,16$, $p < 0,001$, mientras que no hubo interacción entre ambas variables. Los análisis posthoc de estos efectos muestran que los grupos tratados prenatalmente con agua consumieron menos sacarina que los expuestos al alcohol. Por otra parte, el análisis del efecto de Condicionamiento indicó que solo el grupo condicionado con la mayor dosis difirió del grupo no condicionado, independientemente del tratamiento prenatal.

Además, se realizaron comparaciones planeadas entre los principales grupos de interés: en la Prueba, los grupos A-E1 y A-E3 consumieron significativamente menos sacarina que el grupo control A-Sal. Además, el grupo A-E3 consumió significativamente menos que el grupo A-E1. Es decir, que tras dos ensayos de condicionamiento, los sujetos expuestos prenatalmente al agua muestran una clara aversión hacia la sacarina, aunque esta es de mayor magnitud en el grupo condicionado con el EI de mayor intensidad. En el grupo tratado prenatalmente con alcohol, el consumo en la prueba

fue similar al observado en el C2, es decir, solo el grupo E-E3 mostró una aversión significativa con respecto al grupo control E-Sal. Además, el grupo A-E3 mostró una mayor aversión en la Prueba que el grupo E-E3.

Por último, mediante la t-de student se pudo comprobar que mientras el consumo de los sujetos del grupo A-E3 no difirió entre el ensayo C2 y la Prueba, los sujetos del grupo E-E3 mostraron una mayor aversión a la sacarina en la Prueba que en el C2, es decir, tras dos ensayos de condicionamiento con el EI de mayor intensidad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento muestran que la exposición prenatal al alcohol afecta a la adquisición de un aprendizaje aversivo postnatal cuando el alcohol actúa como EI. Así, se observó que sujetos sin experiencia prenatal con alcohol adquirieron rápidamente una aversión condicionada con solo un ensayo de condicionamiento. Este condicionamiento se vio atenuado en los sujetos expuestos prenatalmente al alcohol, ya que solo lo adquirieron aquellos sujetos condicionados con el EI de mayor intensidad y precisaron de dos ensayos de condicionamiento para mostrar una aversión similar en magnitud a la de los sujetos no expuestos al alcohol en el útero. Es decir, la exposición prenatal al alcohol impidió el condicionamiento postnatal con la dosis más baja de alcohol y con la dosis mayor, este condicionamiento se vio debilitado.

Estos resultados corroboran que el alcohol tanto en dosis relativamente altas como bajas (1-3 g/kg) es un estímulo incondicionado efectivo para generar aversiones condicionadas a sabores neutros en crías de rata con tan solo un ensayo de condicionamiento. Esto resulta de interés ya que el alcohol en dosis bajas es una droga de rápida eliminación y relativamente menos tóxica que el LiCl, el agente empleado comúnmente como EI tanto en adultos como en crías.

Pero en relación a los objetivos de este experimento, los resultados apoyan parte de la hipótesis planteada, aquella referida al efecto de preexposición al EI observado por la exposición prenatal al alcohol cuando el EI durante el condicionamiento es de alta intensidad (dosis de 3 g/kg). Sin embargo, los resultados de los grupos condicionados con el EI de menor intensidad (dosis de 1 g/kg) no apoyaron la hipótesis referida a la sensibilización a los efectos incondicionados del alcohol por exposición a dosis bajas. Es decir, los sujetos expuestos prenatalmente al alcohol no sólo no se condicionaron más fácilmente que los no expuestos a la droga, si no que no mostraron aversión alguna. Estos últimos resultados no coinciden con aquellos en los que se basaba la hipótesis, es decir, aquellos en los que se observó una sensibilización a los efectos reforzantes del alcohol en dosis bajas tras su exposición prenatal (Nizhnikov et al., 2006). Sin embargo hay que tener en cuenta que en aquel estudio durante el condicionamiento se usaron dosis más bajas de alcohol (0,25; 0,5 y 0,75 g/kg) y que se observó que tenían

efectos reforzantes apetitivos en lugar de aversivos. Además, Nizhnikov y colaboradores (2006) realizaron sus estudios en crías neonatas, por lo que no se descarta que la diferencia en los resultados obtenidos se deba a alguna de estas diferencias metodológicas.

Por otra parte, los resultados encontrados con el condicionamiento con el EI de mayor intensidad son acordes con los de estudios previos en este laboratorio. Tal como se ha comentado en la introducción de este experimento, la exposición prenatal al alcohol se ha visto que atenúa la respuesta de aversión condicionada, facilitando la extinción de la misma, cuando el alcohol actúa como EC y como EI (Arias y Chotro, 2006; Chotro et al., 2009). Por lo tanto, se puede concluir que la exposición prenatal a los efectos incondicionados del alcohol (EI) interfiere en la subsecuente adquisición de una aversión condicionada en la etapa postnatal, mediante el efecto de preexposición al EI.

Es la primera vez que se demuestra el efecto de preexposición al EI en la etapa prenatal y con crías de una edad tan temprana durante el condicionamiento. Es interesante destacar también que este efecto se ha observado a pesar del gran cambio de contexto que ha ocurrido entre la fase de preexposición al EI en el ambiente prenatal, y la fase de condicionamiento en el ambiente postnatal. Esto parece descartar el fenómeno de bloqueo como mecanismo explicativo del efecto de preexposición al EI, al menos en crías de rata, y apoyaría las explicaciones alternativas relacionadas

con fenómenos de aprendizaje no asociativo, tal como tolerancia y la habituación al El propuestas en otros estudios realizados en la temprana ontogenia (Stefania Castello et al., 2012; Revilla et al., 2013). De hecho, hay estudios mostrando el desarrollo de tolerancia a los efectos incondicionados del alcohol en crías de rata (Castello, Revilla, Molina, y Arias, 2015).

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue el de analizar las consecuencias de la experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales y/o farmacológicas del etanol sobre la respuesta postnatal al sabor y olor etílicos, a sus propiedades incondicionales, o a otros estímulos quimiosensoriales experimentados de forma conjunta con el etanol. Más específicamente, el primer experimento fue diseñado para investigar cómo afecta la intensidad de la experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales del etanol, en ausencia de reforzamiento, a la atracción por el olor etílico en neonatos y al consumo y la palatabilidad del etanol en la infancia. En el segundo experimento se investigó la posibilidad de que se pueda transferir el valor hedónico apetitivo del etanol a otro estímulo quimiosensorial expuesto prenatalmente de forma contigua al etanol, induciendo un incremento en su consumo y palatabilidad en la etapa infantil. En un tercer trabajo se intentó detectar y cuantificar el acetaldehído y el etanol en el tejido cerebral materno y de sus fetos al DG 20. En un cuarto experimento se estudió si la exposición prenatal a un estímulo quimiosensorial no etílico, tanto solo como en compañía de las propiedades incondicionales apetitivas del alcohol, interfiere en el condicionamiento aversivo de este sabor en la infancia. Por último, se investigó si la exposición prenatal al alcohol modifica su capacidad de actuar como estímulo incondicionado aversivo en la infancia y si esto es dependiente de la intensidad de la dosis de alcohol empleada en el condicionamiento.

Los resultados del primer experimento mostraron que los neonatos de rata pueden expresar una atracción por el olor del alcohol cuando, en ausencia de reforzamiento apetitivo, la exposición prenatal a las propiedades quimiosensoriales del alcohol ha sido suficientemente intensa. Los resultados del segundo experimento revelaron que la exposición prenatal a la vainilla junto con el alcohol induce no sólo una mayor atracción por ese olor en la etapa neonatal, sino que además genera una respuesta de mayor consumo de vainilla en la etapa infantil, aunque no se observan cambios en la palatabilidad de este sabor. Además, la eliminación del acetaldehído durante la exposición prenatal a la vainilla y el alcohol se ha visto que impide la observación del mencionado incremento en las respuestas ante la vainilla. Los resultados del tercer experimento mostraron niveles similares de alcohol en cerebro de los fetos y de las madres, tras la administración de esta droga a las ratas preñadas. Sin embargo, no se consiguió detectar acetaldehído en el tejido cerebral analizado. Los resultados del cuarto experimento mostraron que la exposición prenatal a la vainilla facilita el condicionamiento postnatal de este sabor, tanto si se expone sola como junto con el alcohol. Finalmente, los resultados del quinto experimento mostraron que la exposición prenatal al alcohol dificulta el condicionamiento aversivo postnatal cuando el alcohol actúa como estímulo incondicionado.

Estos resultados en su conjunto apoyan la hipótesis general de esta tesis, ya que se ha visto que la administración

de alcohol durante los últimos días de la gestación genera una experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales y los efectos farmacológicos del alcohol, la cual: a) modifica la respuesta neonatal e infantil ante el olor y sabor del alcohol, b) puede modificar la respuesta postnatal ante otros estímulos experimentados de forma conjunta con el alcohol, c) interfiere con el aprendizaje condicionado postnatal y d) atenúa las consecuencias incondicionales aversivas de esta droga.

Los resultados del experimento 1, además de apoyar la hipótesis planteada para dicho experimento, también dan respuesta a algunas cuestiones surgidas en estudios previos de nuestro laboratorio (Díaz-Cenzano et al., 2014; Gaztañaga et al., 2017). Específicamente, resuelve la pregunta sobre si la exposición prenatal al alcohol en ausencia de reforzamiento puede inducir una atracción neonatal hacia las propiedades quimiosensoriales de la droga, tal como se observa con otros olores no etílicos. En este estudio se observó que, aumentando la cantidad de alcohol disponible durante la gestación, para favorecer la percepción quimiosensorial del alcohol en ausencia del acetaldehído, los neonatos muestran una atracción por el olor del alcohol. Sin embargo, esta atracción observada al DP 1 no se tradujo en un mayor consumo de alcohol ni en una mayor palatabilidad del sabor etílico en la infancia. Estos últimos resultados apoyan la hipótesis de que para observar una mayor aceptación del alcohol en la infancia (consumo y palatabilidad), es necesaria la presencia de un reforzador apetitivo durante la experiencia fetal con el olor y

sabor del alcohol. Es decir, durante la exposición al alcohol, en ausencia de los efectos psicofarmacológicos del acetaldehído, el feto no adquiere un aprendizaje condicionado apetitivo hacia el olor etílico. Por lo tanto, la mayor atracción por el olor del alcohol observada inmediatamente tras el nacimiento, es el resultado de un aprendizaje no asociativo, es decir un efecto de familiaridad, el cual no parece ser retenido hasta la infancia; o al menos no se detecta un cambio en la respuesta directa ante el sabor etílico a esa edad.

Este mismo efecto de familiaridad, que se expresa como una mayor atracción neonatal por el olor experimentado en el útero, pero que no parece ser retenido hasta la infancia, es el que se observa al administrar sustancias como la vainilla, que posee características quimiosensoriales pero carece de efectos incondicionales. Por ello el especial interés de los resultados del experimento 2 confirmando nuestra hipótesis de que el valor hedónico del alcohol puede ser transferido a otros olores experimentados conjuntamente en la etapa prenatal. Es la primera vez que se comprueba que es posible una asociación entre el potencial reforzador apetitivo del alcohol y otro olor/sabor no etílico en el útero. Este efecto, que derivó en un mayor consumo de vainilla, se vio eliminado cuando la experiencia quimiosensorial con vainilla y alcohol tuvo lugar en ausencia de acetaldehído (por administración de D-penicilamina). Lo que a su vez apoya, una vez más, la idea de que el EI que actúa en el aprendizaje fetal que ocurre tras la administración de alcohol, más que el efecto

de esta droga, es el efecto apetitivo de su primer metabolito. Por otro lado, este resultado muestra que el aprendizaje generado prenatalmente se retiene al menos hasta la infancia del sujeto. Estos resultados son también de interés considerando que la probabilidad de que el feto sea expuesto al alcohol en conjunto con otros estímulos quimiosensoriales que llegan al líquido amniótico es elevada. Por una parte, el alcohol se consume en muchas ocasiones junto con alimentos, que poseen aromas que llegan al líquido amniótico, y por otra las mismas bebidas alcohólicas contienen diferentes sustancias aromáticas que pueden ser percibidas por el feto. La capacidad fetal de asociar esos estímulos quimiosensoriales, carentes de valor hedónico, con las propiedades apetitivas del alcohol, sugiere que se podrían estar generando preferencias condicionadas por dichos sabores, las cuales pueden ser retenidas hasta la infancia y que podrían incidir en un consumo exacerbado de sustancias conteniendo esos mismos estímulos.

Aunque el objetivo del experimento 3 era conseguir una medida directa de la presencia del acetaldehído en el cerebro fetal, tras la administración materna de alcohol, esto no fue posible con las condiciones y parámetros empleados en este estudio. Tal como se comentó, una de las posibles razones se relaciona con las muestras del tejido analizado, tanto de las madres como de los fetos, ya que eran de cerebros completos homogeneizados. La selección de estructuras o áreas concretas, en las cuales se sabe que abunda la expresión de

catalasas y por ende la producción de acetaldehído, podría facilitar la concentración del acetaldehído en la muestra y por ende la detección del mismo. Otro factor que puede haber intervenido es el tiempo transcurrido entre la obtención de las muestras y su análisis. Una tercera causa se refiere al método empleado, que a pesar de ser supuestamente idóneo para detectar cantidades mínimas de acetaldehído en cerebro de rata, puede no ser el mejor a la hora de detectar las cantidades relativamente bajas que se producen en nuestra preparación. Tal como se había comentado anteriormente, existen numerosas dificultades para detectar de forma directa las bajas concentraciones de acetaldehído en tejido cerebral, por lo que la mayoría de los estudios en los que se analizan los efectos del acetaldehído en el cerebro infieren su presencia por métodos indirectos, como la cuantificación de aductos de acetaldehído con neurotransmisores, por ejemplo el Salsolinol (acetaldehído y dopamina) que son más estables y menos volátiles (Mao et al., 2010). A pesar de no haber conseguido detectar el acetaldehído en este experimento, se ha podido confirmar que 60 minutos tras la administración i.g. de alcohol a las madres gestantes, el alcohol se detecta claramente, tanto en el cerebro de la madre como del feto, y que la concentración de alcohol en tejido cerebral fetal es incluso mayor que en el materno (Guerra y Sanchis, 1985; Nava-Ocampo et al., 2004). Considerando este resultado y que en el cerebro fetal la concentración de catalasas es mayor incluso que en adultos, podemos inferir que, aunque no hayamos

conseguido detectarlo, el acetaldehído necesariamente está presente en el tejido cerebral de los fetos tras la administración de alcohol a la madre gestante.

Los resultados de los dos primeros experimentos indican que la experiencia fetal con un estímulo quimiosensorial sin consecuencias incrementa la atracción neonatal por ese olor pero no se observa un cambio en la respuesta directa hacia dicho estímulo quimiosensorial cuando se evalúa dos semanas después del nacimiento. Sin embargo, los resultados del experimento 4 revelan que dicha experiencia prenatal puede interferir con el aprendizaje infantil sobre el mismo estímulo. Efectivamente, la exposición prenatal a la vainilla, a pesar de no incrementar el consumo directo de este sabor, facilitó el condicionamiento aversivo del mismo. Estos resultados concuerdan con los de estudios previos que muestran que en crías de rata, bajo ciertas condiciones, la preexposición al EC produce una facilitación del aprendizaje, en lugar del retraso observado por el efecto de inhibición latente (Chotro y Alonso, 1999; 2001; 2003). Esta facilitación del aprendizaje en crías, se considera que obedece a que la inmadurez de las crías no les permite en ciertas situaciones procesar completamente el EC. Por lo que una exposición previa ayudaría a los sujetos a enfocar la atención ante ese estímulo y completar dicho procesamiento, lo que redundaría en una mejor asociación con el EI (Alonso y Chotro, 2004; Gaztañaga et al., 2014). Los resultados de este experimento constituyen la primera evidencia de facilitación

de una aversión condicionada al sabor por exposición prenatal al EC. Por otra parte, lo que resulta sorprendente y requeriría un análisis más exhaustivo es el hecho de que, a pesar de que las evidencias indican que la experiencia prenatal con estos estímulos tiene valor hedónico apetitivo (mayor atracción por su olor), ésta facilita el subsiguiente aprendizaje aversivo del mismo estímulo. Esto resulta cuanto menos paradójico, ya que cabría esperar el resultado contrario, es decir un retraso en la adquisición de la aversión condicionada por un efecto de contracondicionamiento. Sin embargo, estos resultados apoyan la idea de que la experiencia prenatal ayuda al mejor procesamiento postnatal del estímulo, independientemente del valor hedónico que tiene el mismo en cada etapa del desarrollo.

Por último, los resultados obtenidos en el experimento 5 nos dejan varios aspectos a tomar en consideración. Por un lado, confirma la capacidad del alcohol de actuar como El efectivo para generar aversiones condicionadas al sabor en la infancia de la rata, tanto con dosis relativamente altas (3 g/kg) como con dosis menores (1 g/kg). Este es un dato que resulta de especial relevancia, considerando que el alcohol es relativamente menos tóxico, se elimina más rápido y por lo tanto produce menos malestar en las crías, que el LiCl, el agente tóxico usado tradicionalmente como El para generar aversiones al sabor. En relación a la hipótesis del experimento, los resultados confirman que la exposición prenatal al alcohol reduce la capacidad de esta droga de actuar como El aversivo.

Este resultado constituye la primera evidencia clara del “efecto de preexposición al EI” por exposición al alcohol durante la etapa prenatal. En anteriores estudios en los que se encontraron resultados similares, debido al diseño de los mismos, no era posible discriminar si se trataba de un efecto de preexposición al EC o al EI (Arias y Chotro, 2006; Chotro, Arias y Spear, 2009). Asimismo, es destacable que este efecto se haya observado a pesar del drástico cambio de contexto que ocurre entre la fase de preexposición al EI y el condicionamiento, del contexto prenatal al postnatal. Esto último descarta la explicación del efecto de preexposición al EI por el fenómeno del bloqueo, dejando lugar a otros fenómenos de aprendizaje no asociativo tales como la habituación al EI planteados en trabajos previos (Castello et al, 2011; Reville et al., 2012; Castello, Reville, Molina & Arias, 2015). Los resultados de este último experimento muestran, además de todo lo comentado, que la exposición a una dosis relativamente moderada de alcohol durante la última etapa de la gestación, reduce la posibilidad de que el sujeto más adelante en el desarrollo adquiriera una aversión al alcohol tras una experiencia potencialmente aversiva. Es decir, la exposición prenatal al alcohol, por un lado, reduce el potencial aversivo de la intoxicación etílica y por otra parte genera una preferencia condicionada prenatal por el alcohol que incrementa su aceptación y consumo. La suma de estos dos efectos confirma que el consumo materno de alcohol en la gestación incrementa considerablemente las posibilidades de

que los sujetos expuestos desarrollen un consumo problemático de alcohol en etapas posteriores de la ontogenia.

CONCLUSIONES

De los resultados de los experimentos de esta tesis, se pueden extraer principalmente las siguientes conclusiones:

- La experiencia prenatal con las propiedades quimiosensoriales del alcohol, en ausencia de sus efectos farmacológicos, puede generar una atracción neonatal por su olor, siempre y cuando la experiencia prenatal haya sido suficientemente intensa. Esta atracción por el olor etílico refleja la familiaridad del neonato con el estímulo percibido en el ambiente prenatal. Sin embargo, dicho aprendizaje no-asociativo no se expresa en la infancia como un aumento en el consumo o en la palatabilidad del alcohol; lo que solo ocurre cuando el feto tiene la oportunidad de percibir el sabor-olor del alcohol (el EC) junto con sus efectos incondicionales (EI).
- La exposición prenatal a un estímulo quimiosensorial neutro junto con el alcohol, puede inducir un condicionamiento apetitivo hacia dicho estímulo, que resulta en un aumento en el consumo de este sabor en la infancia. Es decir, el feto puede asociar a las propiedades incondicionales apetitivas del alcohol, no solo al sabor y olor de esta droga, si no que también a otros estímulos quimiosensoriales presentes en el líquido amniótico durante la intoxicación etílica.
- Se confirma que las propiedades incondicionales del alcohol, que participan en el aprendizaje fetal en

relación a esta droga u a otros estímulos presentes durante la exposición etílica, están mediadas por los efectos de su primer metabolito, el acetaldehído.

- La mera exposición a un estímulo quimiosensorial durante los últimos días de la gestación puede facilitar el condicionamiento aversivo del mismo en la infancia.
- El alcohol es un EI aversivo efectivo para generar aversiones condicionadas al sabor en crías de rata, tanto cuando se administra en dosis altas como en dosis relativamente moderadas.
- La exposición prenatal a los efectos incondicionales del alcohol retrasa el condicionamiento aversivo de un sabor cuando el alcohol actúa como EI. Es decir, es posible observar el "efecto de preexposición al EI" con alcohol cuando este se expone en la etapa prenatal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, P., Pepino, Y. M., Domínguez, D. H., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2000). Fetal associative learning mediated through maternal alcohol intoxication. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(1), 39–47.
<https://doi.org/10.1097/00000374-200001000-00007>
- Abate, P., Pueta, M., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2008). Fetal Learning About Ethanol and Later Ethanol Responsiveness: Evidence Against “Safe” Amounts of Prenatal Exposure. *Experimental Biology & Medicine*, 233(2), 139–154. <https://doi.org/10.3181/0703-MR-69>.Fetal
- Abate, P., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2001). Fetal and infantile alcohol-mediated associative learning in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(7), 989–998.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02307.x>
- Abate, P., Varlinskaya, E. I., Cheslock, S. J., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2002). Neonatal activation of alcohol-related prenatal memories: impact on the first suckling response. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(10), 1512–1522.
- Abbott, P., Thompson, A. C., Ferguson, E. J., Doerr, J. C., Tarapacki, J. A., Kostyniak, P. J., Syracuse, J. A., Cartonia, D. M. & Kristal, M. B. (1991). Placental opioid-enhancing factor (POEF): Generalizability of effects. *Physiology & Behavior*, 50(5), 933–940.
- Abel, E L., & Dintcheff, B. A. (1984). Factors affecting the outcome of maternal alcohol exposure: II. Maternal age. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 7(3), 263—266.
Retrieved from
<http://europepmc.org/abstract/MED/4033867>
- Abel, E L., & York, J. L. (1979). Age-related differences in response to ethanol in the rat. *Physiological Psychology*, 7(4), 391–395. <https://doi.org/10.3758/BF03326662>
- Abrams, K., Kushner, M., Medina, K. L., & Voight, A. (2001). The pharmacologic and expectancy effects of alcohol on social anxiety in individuals with social phobia. *Drug and Alcohol Dependence*, 64(2), 219–231.
- Acquas, E., Meloni, M., & Di Chiara, G. (1993). Blockade of δ -

- opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *European Journal of Pharmacology*, 230(2), 239–241.
- Aghaie, C. I., Hausknecht, K. A., Wang, R., Dezfuli, P. H., Haj-Dahmane, S., Kane, C. J. M., Sigurdson, W. J. & Shen, R. Y. (2020). Prenatal Ethanol Exposure and Postnatal Environmental Intervention Alter Dopaminergic Neuron and Microglia Morphology in the Ventral Tegmental Area During Adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44(2), 435–444.
<https://doi.org/10.1111/acer.14275>
- Alati, R., Al Mamun, A., Williams, G. M., O’Callaghan, M., Najman, J. M., & Bor, W. (2006). In Utero Alcohol Exposure and Prediction of Alcohol Disorders in Early Adulthood. *Archives of General Psychiatry*, 63.
- Alati, R., MacLeod, J., Hickman, M., Sayal, K., May, M., Smith, G. D., & Lawlor, D. A. (2008). Intrauterine exposure to alcohol and tobacco use and childhood IQ: findings from a parental-offspring comparison within the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Pediatric Research*, 64(6), 659–666.
- Alfonso-Loeches, S., & Guerri, C. (2011). Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(1), 19–47.
<https://doi.org/10.3109/10408363.2011.580567>
- Alonso, G., & Chotro, M. G. (2004). Desarrollo ontogénico y aprendizaje.
- 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 and Alcohol Dependence*, 2, 495–500.
- Amit, Z., Smith, B. R., & Weiss, S. (1999). Catalase as a regulator of the propensity to ingest alcohol in genetically determined acatalasemic individuals from Israel. *Addiction Biology*, 4(2), 215–221.

<https://doi.org/10.1080/13556219971731>

- Aragon, C. M. G., & Amit, Z. (1993). Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: Systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *44*(3), 547–554. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90165-P](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90165-P)
- Aragon, C. M. G., Spivak, K., & Amit, Z. (1989). Effects of 3-Arnino-1,2,4-triazole on Ethanol-induced Open-Field Activity: Evidence for Brain Catalase Mediation of Ethanol's Effects. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *13*(1), 104–108. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1989.tb00293.x>
- Aragon, C. M. G., Sternklar, G., & Amit, Z. (1985). A Correlation Between Voluntary Ethanol Consumption and Brain Catalase Activity in the Rat. *Alcohol ~ Ankho International Lnc*, *2*, 353–356.
- Aragon, C. M., Rogan, F., & Amit, Z. (1992). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H₂O₂ system. *Biochemical Pharmacology*, *44*(1), 93–98.
- Arias, C., & Chotro, M. G. (2005a). Increased palatability of ethanol after prenatal ethanol exposure is mediated by the opioid system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *82*(3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.09.015>
- Arias, C., & Chotro, M. G. (2005b). Increased preference for ethanol in the infant rat after prenatal ethanol exposure, expressed on intake and taste reactivity tests. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *29*(3), 337–346. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000156115.35817.21>
- Arias, C., & Chotro, M. G. (2006a). Ethanol-induced preferences or aversions as a function of age in preweanling rats. *Behavioral Neuroscience*, *120*(3), 710–718. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.3.710>
- Arias, C., & Chotro, M. G. (2006b). Ethanol-induced preferences or aversions as a function of age in preweanling rats. *Behavioral Neuroscience*, *120*(3), 710–718. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.3.710>

- Arias, C., & Chotro, M. G. (2006). Interactions between prenatal ethanol exposure and postnatal learning about ethanol in rat pups. *Alcohol*, 40(1), 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.10.002>
- Arias, C., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2009). Ethanol-mediated aversive learning as a function of locomotor activity in a novel environment in infant Sprague-Dawley rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(4), 621–628.
- Armitage, S. E., Baldwin, B. A., & Vince, M. A. (1980). The fetal sound environment of sheep. *Science*, 208(4448), 1173–1174. <https://doi.org/10.1126/science.7375927>
- Arnold, H. M., Robinson, S. R., Spear, N. E., & Smotherman, W. P. (1993). Conditioned opioid activity in the rat fetus. *Behavioral Neuroscience*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.6.963>
- Backstrand, J. R., Allen, L. H., Martinez, E., & Peltó, G. H. (2001). Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Public Health Nutrition*, 4(4), 883–891. <https://doi.org/10.1079/phn2001130>
- Badger, T. M., Hidestrand, M., Shankar, K., McGuinn, W. D., & Ronis, M. J. (2005). The effects of pregnancy on ethanol clearance. *Life Sciences*, 77(17), 2111–2126.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.02.019>
- Baer, J. S., Barr, H. M., Bookstein, F. L., Sampson, P. D. & Streissguth, A. P. (1998). Prenatal Alcohol Exposure and Family History of Alcoholism in the Etiology of Adolescent Alcohol Problems *. *Journal of Studies on Alcohol*, 533–543.
- Baer, J. S., Sampson, P. D., Barr, H. M., Connor, P. D., & Streissguth, A. P. (2003). A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Archives of General Psychiatry*, 60(4), 377–385.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.4.377>
- Barbier, E., Houchi, H., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., & Naassila, M. (2009). Effects of prenatal and postnatal maternal ethanol on offspring response to alcohol and

- psychostimulants in long evans rats. *Neuroscience*, 161(2), 427–440.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.076>
- Barker, L. M., & Johns, T. (1978). Effect of ethanol preexposure on ethanol-induced conditioned taste aversion. *Journal of Studies on Alcohol*, 39(1), 39–46.
<https://doi.org/10.15288/jsa.1978.39.39>
- Becker, H. C., Hale, R. L., Boggan, W. O., & Randall, C. L. (1993). Effects of Prenatal Ethanol Exposure on Later Sensitivity to the Low-Dose Stimulant Actions of Ethanol in Mouse Offspring: Possible Role of Catecholamines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17(6), 1325–1336.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1993.tb05249.x>
- Bennett, C. H., Tremain, M., & Mackintosh, N. J. (1996). Facilitation and Retardation of Flavour Aversion Conditioning Following prior Exposure to the CS. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B*, 49(3), 220–230. <https://doi.org/10.1080/713932632>
- Berman, R. F., & Cannon, D. S. (1974). The effect of prior ethanol experience on ethanol-induced saccharin aversions. *Physiology and Behavior*, 12(6), 1041–1044.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(74\)90152-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(74)90152-8)
- Berridge, K. C. (2000). Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(2), 173–198. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00072-X)
- Berridge, Kent C. (2000). Reward learning: Reinforcement, incentives, and expectations. *Psychology of Learning and Motivation - Advances in Research and Theory*, 40, 223–278.
[https://doi.org/10.1016/s0079-7421\(00\)80022-5](https://doi.org/10.1016/s0079-7421(00)80022-5)
- Biggio, F., Talani, G., Locci, V., Pisu, M. G., Boero, G., Ciarlo, B., Grayson, D. R. & Serra, M. (2018). Low doses of prenatal ethanol exposure and maternal separation alter HPA axis function and ethanol consumption in adult male rats. *Neuropharmacology*, 131, 271–281.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.005>
- Bilkó, Á., Altbäcker, V., & Hudson, R. (1994). Transmission of

- food preference in the rabbit: The means of information transfer. *Physiology and Behavior*, 56(5), 907–912.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90322-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90322-0)
- Blakley, P. M., & Scott, W. J. (1984). Determination of the proximate teratogen of the mouse fetal alcohol syndrome. 1. Teratogenicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 72(2), 355–363.
[https://doi.org/10.1016/0041-008X\(84\)90320-X](https://doi.org/10.1016/0041-008X(84)90320-X)
- Blasco-Alonso, M., González-Mesa, E., Montes, M. G., Bravo, I. L., Galdón, F. M., Campos, F. C., Schiaffino, G. M., Torres, S. P., Peral, J. H. & Estévez, I. B. (2015). Exposición a tabaco, alcohol y drogas de abuso en gestantes. Estudio de prevalencia en gestantes de Málaga (España). *Adicciones*, 27(2), 99–108. <https://doi.org/10.20882/adicciones.695>
- Boehm, S. L., Reed, C. L., McKinnon, C. S., & Phillips, T. J. (2002). Shared genes influence sensitivity to the effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors, and the stress axis. *Psychopharmacology*, 161(1), 54–63.
- Boleda, M. D., Farrés, J., Guerri, C., & Parést, X. (1992). Effect of maternal ethanol consumption, 43(7), 1555–1561.
- Bond, N. W., & di Giusto, E. L. (1976). Effects of prenatal alcohol consumption on open-field behaviour and alcohol preference in rats. *Psychopharmacologia*, 46(2), 163–165.
<https://doi.org/10.1007/BF00421386>
- Brzezinski, M. R., Boutelet-Bochan, H., Person, R. E., Fantel, A. G., & Juchau, M. R. (1999). Catalytic activity and quantitation of cytochrome P-450 2E1 in prenatal human brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1648–1653.
- Cantwell, D. P. (1972). Psychiatric Illness in the Families of Hyperactive Children. *Archives of General Psychiatry*, 27(3), 414–417.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1972.01750270114018>
- Cao, Q. N., Tu, G. C., & Weiner, H. (1989). Presence of cytosolic aldehyde dehydrogenase isozymes in adult and fetal rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 38(1), 77–83.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90152-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90152-4)

- Castello, S., Revillo, D. A., Molina, J. C., & Arias, C. (2015). Ethanol-induced tolerance and sex-dependent sensitization in preweanling rats. *Physiology and Behavior*, *139*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.008>
- Castello, S., Bobbio, A., Orellana, E., & Arias, C. (2012). Signaling the unconditioned stimulus during the preexposure phase does not attenuate the unconditioned stimulus preexposure effect in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, *54*(8), 808–817. <https://doi.org/10.1002/dev.21001>
- Chao, H. M. (1995). Alcohol and the Mystique of Flushing. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *19*(1), 104–109. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1995.tb01477.x>
- Chen, W. J. A., McAlhany Jr, R. E., & West, J. R. (1995). 4-Methylpyrazole, an alcohol dehydrogenase inhibitor, exacerbates alcohol-induced microencephaly during the brain growth spurt. *Alcohol*, *12*(4), 351–355.
- Chen, Y. C., Peng, G. S., Tsao, T. P., Wang, M. F., Lu, R. B., & Yin, S. J. (2009). Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for overcoming acetaldehyde-induced adverse reaction in asian alcoholics, heterozygous for the variant ALDH2*2 gene allele. *Pharmacogenetics and Genomics*, *19*(8), 588–599. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32832ecf2e>
- Cheng, Y., Wang, X., Wei, X., Xie, X., Melo, S., Miranda, R. C., & Wang, J. (2018). Prenatal Exposure to Alcohol Induces Functional and Structural Plasticity in Dopamine D1 Receptor-Expressing Neurons of the Dorsomedial Striatum. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *42*(8), 1493–1502. <https://doi.org/10.1111/acer.13806>
- Chotro, M. G., & Alonso, G. (1999). Effects of stimulus preexposure on the generalization of conditioned taste aversions in infant rats. *Developmental Psychobiology*, *35*(4), 304–317. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199912\)35:4<304::AID-DEV5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199912)35:4<304::AID-DEV5>3.0.CO;2-O)
- Chotro, M. G., & Alonso, G. (2001). Some Parameters of Stimulus Preexposure that Affect in Infant Rats. *International Journal of Comparative Psychology*, *14*(1), 43–

63.

- Chotro, M. G., & Alonso, G. (2003). Stimulus preexposure reduces generalization of conditioned taste aversions between alcohol and non-alcohol flavors in infant rats. *Behavioral Neuroscience, 117*(1), 113–122. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.1.113>
- Chotro, M. G., & Arias, C. (2003). Prenatal exposure to ethanol increases ethanol consumption: A conditioned response? *Alcohol, 30*(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(03\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(03)00037-5)
- Chotro, M. G., & Arias, C. (2007). Ontogenetic difference in ethanol reinforcing properties: The role of the opioid system. *Behavioural Pharmacology, 18*(7), 661–666. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282f00754>
- Chotro, M. G., Arias, C., & Laviola, G. (2007). Increased ethanol intake after prenatal ethanol exposure: Studies with animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 31*(2), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.021>
- Chotro, M. G., Arias, C., & Spear, N. E. (2009). Binge ethanol exposure in late gestation induces ethanol aversion in the dam but enhances ethanol intake in the offspring and affects their postnatal learning about ethanol. *Alcohol, 43*(6), 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.08.001>
- Chotro, M. G., & Spear, N. E. (1997a). Repeated exposure to moderate doses of alcohol in the rat fetus: Evidence of sensitization to toxic and chemosensory aspects of alcohol. *Alcoholism—Clinical and Experimental Research, 21*(2), 360–367. Retrieved from isi:A1997WU25800027
- Chotro, M. G., & Spear, N. E. (1997b). Repeated Exposure to Moderate Doses of Alcohol in the Rat Fetus: Evidence of Sensitization to Toxic and Chemosensory Aspects of Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 21*(2), 360–367. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03773.x>
- Chotro, M. G., Kraebel, K. S., McKinzie, D. L., Molina, J. C., & Spear, N. (1996). Prenatal and postnatal ethanol exposure

- influences preweanling rats' behavioral and autonomic responding to ethanol odor. *Alcohol*, 13(4), 377–385.
[https://doi.org/10.1016/0741-8329\(96\)00027-4](https://doi.org/10.1016/0741-8329(96)00027-4)
- Chudley, A. E., Conry, J., Cook, J. L., Looock, C., Rosales, T., & LeBlanc, N. (2005). Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. *Cmaj*, 172(5 SUPPL.).
<https://doi.org/10.1503/cmaj.1040302>
- Cicero, T. J. (1982). Alcohol Effects Effects on the Endocrine. *Biomedical Processes and Consequences of Alcohol Use*, (2), 53.
- Clarke, D. W., Steenaart, N. A. E., Slack, C. J., & Brien, J. F. (1986). Pharmacokinetics of ethanol and its metabolite, acetaldehyde, and fetolethality in the third-trimester pregnant guinea pig for oral administration of acute, multiple-dose ethanol. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(8), 1060–1067.
<https://doi.org/10.1139/y86-182>
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 301–308.
- Cohen, G., Sinet, P. M., & Heikkila, R. (1980). Ethanol Oxidation by Rat Brain in Vivo. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 4(4), 366–370.
- Comasco, E., Rangmar, J., Eriksson, U. J., & Oreland, L. (2018). Neurological and neuropsychological effects of low and moderate prenatal alcohol exposure. *Acta Physiologica*, 222(1), e12892. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Coopersmith, R., Lee, S., & Leon, M. (1986). Olfactory bulb responses after odor aversion learning by young rats. *Developmental Brain Research*, 24(1–2), 271–277.
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(86\)90195-1](https://doi.org/10.1016/0165-3806(86)90195-1)
- Cornelius, M. D., De Genna, N., Goldschmidt, L., Larkby, C., & Day, N. (2016a). Adverse Environmental Exposures During Gestation and Childhood: Predictors of Adolescent Drinking. *Substance Use and Misuse*, 51(10), 1253–1263.

<https://doi.org/10.3109/10826084.2016.1162812>

- Cornelius, M. D., De Genna, N. M., Goldschmidt, L., Larkby, C., & Day, N. L. (2016b). Prenatal alcohol and other early childhood adverse exposures: Direct and indirect pathways to adolescent drinking. *Neurotoxicology and Teratology*, *55*, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.001>
- Cornell, E. H. (1979). Infants' recognition memory, forgetting, and savings. *Journal of Experimental Child Psychology*, *28*(2), 359–374. [https://doi.org/10.1016/0022-0965\(79\)90095-X](https://doi.org/10.1016/0022-0965(79)90095-X)
- Cornwell-Jones, C., & Sobrian, S. K. (1977). Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiology & Behavior*. Netherlands: Elsevier Science. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90044-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90044-0)
- Correa, M., Manrique, H. M., Font, L., Escrig, M. A., & Aragon, C. M. G. (2008). Reduction in the anxiolytic effects of ethanol by centrally formed acetaldehyde: The role of catalase inhibitors and acetaldehyde-sequestering agents. *Psychopharmacology*, *200*(4), 455–464.
<https://doi.org/10.1007/s00213-008-1219-3>
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. G. (1999). Acute Lead Acetate Administration Potentiates Ethanol-Induced Locomotor Activity in Mice: The Role of Brain Catalase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *23*(5), 799–805. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04186.x>
- Correa, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. G. (2001). Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug and Alcohol Dependence*, *65*(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(01\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(01)00142-9)
- Correa, M., Sanchis-Segura, C., Pastor, R., & Aragon, C. M. G. (2004). Ethanol intake and motor sensitization: The role of brain catalase activity in mice with different genotypes. *Physiology and Behavior*, *82*(2–3), 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.03.033>

- Correa, M., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2000). Lead acetate potentiates brain catalase activity and enhances ethanol-induced locomotion in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *66*(1), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00204-5)
- Correa, M., Miquel, M., Sanchis-Segura, C., & Aragon, C. M. G. (1999). Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol*, *19*(1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00023-3](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00023-3)
- Correa, M., Salamone, J. D., Segovia, K. N., Pardo, M., Longoni, R., Spina, L., Peana, A.T., Vinci, S. & Acquas, E. (2012). Piecing together the puzzle of acetaldehyde as a neuroactive agent. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(1), 404–430. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.009>
- Coutts, D. J. C., & Harrison, N. L. (2015). Acetaldehyde, not ethanol, impairs myelin formation and viability in primary mouse oligodendrocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *39*(3), 455–462. <https://doi.org/10.1111/acer.12642>
- Crabb, D. W., & Liangpunsakul, S. (2007). Acetaldehyde generating enzyme systems: roles of alcohol dehydrogenase, CYP2E1 and catalase, and speculations on the role of other enzymes and processes. In *Novartis Foundation Symposium* (Vol. 285, p. 4). Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Crabb, D. W., Matsumoto, M., Chang, D., & You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the Nutrition Society*, *63*(1), 49–63. <https://doi.org/10.1079/pns2003327>
- Dalt, L. DA, Dall'Amico, R., Laverda, A. M., Chemollo, C., & Chiandetti, L. (1991). Percutaneous ethyl alcohol intoxication in one-month old infant. *Pediatric Emergency Care*, *7*(6).
- DeCasper, A., & Fifer, W. P. (1980). Of Human Bonding:

- Newborns Prefer Their Mothers' Voices. *Science*, 208(6), 1174–1176.
- Deitrich, R. A. (1987). Specificity of the action of ethanol in the central nervous system: behavioral effects. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement*, 1, 133–138. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/3322305>
- Del Maestro, R., & McDonald, W. (1987). Distribution of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 41(1–2), 29–38. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(87\)90051-0](https://doi.org/10.1016/0047-6374(87)90051-0)
- Deng, X. sheng, & Deitrich, R. A. (2008). Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current Drug Abuse Reviews*, 1(1), 3–8. <https://doi.org/10.2174/1874473710801010003>
- Díaz-Cenzano, E., & Chotro, M. G. (2010a). Prenatal binge ethanol exposure on gestation days 19–20, but not on days 17–18, increases postnatal ethanol acceptance in rats. *Behavioral Neuroscience*, 124(3), 362–369. <https://doi.org/10.1037/a0019482>
- Díaz-Cenzano, E., & Chotro, M. G. (2010b). The effect of taste familiarity on intake and taste reactivity in infant rats. *Developmental Psychobiology*, 52(2), 109–120. <https://doi.org/10.1002/dev.20418>
- Díaz-Cenzano, E., Gaztañaga, M., & Chotro, M. G. (2014). Exposure to ethanol on prenatal days 19–20 increases ethanol intake and palatability in the infant rat: Involvement of kappa and mu opioid receptors. *Developmental Psychobiology*, 56(6), 1167–1178. <https://doi.org/10.1002/dev.21162>
- Díaz-Granados, J. L., & Graham, D. L. (2007). The effects of continuous and intermittent ethanol exposure in adolescence on the aversive properties of ethanol during adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 31(12), 2020–2027. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00534.x>

- Drake, S. L., Lopetcharat, K., & Drake, M. A. (2009). Comparison of two methods to explore consumer preferences for cottage cheese. *Journal of Dairy Science*, *92*(12), 5883–5897.
- Emanuele, M. A., Wezeman, F., & Emanuele, N. V. (2002). Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol Research and Health*, *26*(4), 274–281.
- Ericson, M., Blomqvist, O., Engel, J. A., & Söderpalm, B. (1998). Voluntary ethanol intake in the rat and the associated accumbal dopamine overflow are blocked by ventral tegmental mecamylamine. *European Journal of Pharmacology*, *358*(3), 189–196.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00602-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00602-5)
- Eriksson, C. J., Hillbom, M. E., & Sovijärvi, A. (1979). Difficulties in measuring human acetaldehyde levels. *Drug and Alcohol Dependence*, *4*(1–2), 148.
- Eriksson, C. J. P. (2001). The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *25*, 15S–32S.
- Eriksson, C. J. P., Saarenmaa, T. P. S., Bykov, I. L., & Heino, P. U. (2007). Acceleration of ethanol and acetaldehyde oxidation by d-glycerate in rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *56*(7), 895–898.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.01.019>
- Eriksson, C. J. P., Sippel, H. W., & Forsander, O. A. (1977). The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, *80*(1), 116–124. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90631-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90631-5)
- Eriksson, P. (1985). Endogenous acetaldehyde in rats. *Biochemical Pharmacology*, *34*(22), 3979–3982.
- Escarabajal. (2002). Enzimas cerebrales y psicofarmacología del alcohol. *Adicciones*, *14*(4), 465–478.
- Escarabajal, D., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2000). A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol-induced

- locomotor activity in mice. *Journal of Studies on Alcohol*, 61(4), 493–498. <https://doi.org/10.15288/jsa.2000.61.493>
- Espinet, C., & Argilés, J. M. (1984). Ethanol and acetaldehyde concentrations in the rat foeto-maternal system after an acute ethanol administration given to the mother. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 92(5). <https://doi.org/10.3109/13813458409080609>
- Faas, A. E., March, S. M., Moya, P. R., & Molina, J. C. (2015). Alcohol odor elicits appetitive facial expressions in human neonates prenatally exposed to the drug. *Physiology and Behavior*, 148, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.031>
- Faas, A. E., Spontón, E. D., Moya, P. R., & Molina, J. C. (2000). Differential responsiveness to alcohol odor in human neonates: Effects of maternal consumption during gestation. *Alcohol*, 22(1), 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(00\)00103-8](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(00)00103-8)
- Fabio, M. C., Macchione, A. F., Nizhnikov, M. E., & Pautassi, R. M. (2015). Prenatal ethanol increases ethanol intake throughout adolescence, alters ethanol-mediated aversive learning, and affects μ but not δ or κ opioid receptor mRNA expression. *European Journal of Neuroscience*, 41(12), 1569–1579. <https://doi.org/10.1111/ejn.12913>
- Fahlke, C., Lorenz, J. G., Long, J., Champoux, M., Suomi, S. J., & Higley, J. D. (2000). Rearing experiences and stress-induced plasma cortisol as early risk factors for excessive alcohol consumption in nonhuman primates. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(5), 644–650. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb02035.x>
- Fakhoury, M., de Beaumais, T., Guimiot, F., Azougagh, S., Elie, V., Medard, Y., Delezoide, A. L. & Jacqz-Aigrain, E. (2009). mRNA expression of MDR1 and major metabolising enzymes in human fetal tissues. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24(6), 529–536. <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.529>
- Fernández, M. S., Carrizo, J., Plaza, W., Haeger, P., & Pautassi, R.

- M. (2019). Prenatal ethanol exposure potentiates isolation-induced ethanol consumption in young adult rats. *Alcohol*, *75*, 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.05.006>
- Font, L., Aragon, C. M. G., & Miquel, M. (2006). Voluntary ethanol consumption decreases after the inactivation of central acetaldehyde by d-penicillamine. *Behavioural Brain Research*, *171*(1), 78–86.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.020>
- Font, L., Luján, M. Á., & Pastor, R. (2013). Involvement of the endogenous opioid system in the psychopharmacological actions of ethanol: The role of acetaldehyde. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(JUL), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00093>
- Font, L., Miquel, M., & Aragon, C. M. G. (2005). Prevention of ethanol-induced behavioral stimulation by D-penicillamine: A sequestration agent for acetaldehyde. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *29*(7), 1156–1164.
<https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000171945.30494.AF>
- Fujimiya, T., Yamaoka, K., Ohbora, Y., Aki, T., & Shinagawa, H. (2002). Michaelis-Menten elimination kinetics of acetaldehyde during ethanol oxidation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *26*(8 SUPPL.), 49–54.
<https://doi.org/10.1097/00000374-200208001-00011>
- Gaztañaga, M., Angulo-Alcalde, A., & Chotro, M. G. (2020). Prenatal Alcohol Exposure as a Case of Involuntary Early Onset of Alcohol Use: Consequences and Proposed Mechanisms From Animal Studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*, 26.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00026>
- Gaztañaga, M., Angulo-Alcalde, A., Spear, N. E., & Chotro, M. G. (2017). The role of acetaldehyde in the increased acceptance of ethanol after prenatal ethanol exposure. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00014>
- Gaztañaga, M., Aranda-Fernández, P. E., & Chotro, M. G. (2014).

- Prenatal exposure to vanilla or alcohol induces crawling after these odors in the neonate rat: The role of mu and kappa opioid receptor systems. *Physiology and Behavior*, 148, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.046>
- Gaztañaga, M., Aranda-Fernández, P. E., Díaz-Cenzano, E., & Chotro, M. G. (2015). Latent inhibition and facilitation of conditioned taste aversion in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, 57(1), 96–104. <https://doi.org/10.1002/dev.21263>
- Gianoulakis, C. (2001). Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*. Gianoulakis, Christina: Douglas Hosp Research Ctr, 6875 LaSalle Blvd, Verdun, PQ, Canada, H4H 1R3, christina.gianoulakis@mcgill.ca: Canadian Medical Assn.
- Gianoulakis, C. (2004). Endogenous Opioids and Addiction to Alcohol and other Drugs of Abuse. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(1), 39–50. <https://doi.org/10.2174/1568026043451573>
- Giavini, E., Broccia, M. L., Prati, M., Bellomo, D., & Menegola, E. (1992). Effects of ethanol and acetaldehyde on rat embryos developing in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 28, 205–210.
- Gill, K., Menez, J. F., Lucas, D., & Deitrich, R. A. (1992). Enzymatic Production of Acetaldehyde from Ethanol in Rat Brain Tissue. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 16(5), 910–915. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01892.x>
- Goldschmidt, L., Richardson, G. A., De Genna, N. M., Cornelius, M. D., & Day, N. L. (2019). Prenatal alcohol exposure and offspring alcohol use and misuse at 22 years of age: A prospective longitudinal study. *Neurotoxicology and Teratology*, 71(October 2018), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.11.001>
- Gonzales, R. A., & Weiss, F. (1998). Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with

- attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 18(24), 10663–10671.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-24-10663.1998>
- Gonzalez-Gonzalez, N. L., Suarez, M. N., Perez-Piñero, H., Armas, H., Domenech, E., & Bartha, J. L. (2006). Persistence of fetal memory into neonatal life. *Acta Obstetrica et Gynecologica*, 85(27), 1160–1164.
<https://doi.org/10.1080/00016340600855854>
- Gordon, B. H. J., Baraona, E., Miyakawa, H., Finkelman, F., & Lieber, C. S. (1985). Exaggerated Acetaldehyde Response after Ethanol Administration during Pregnancy and Lactation in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 9(1), 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1985.tb05041.x>
- Graven, S. N., & Browne, J. V. (2008). Auditory Development in the Fetus and Infant. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 8(4), 187–193. <https://doi.org/10.1053/j.nainr.2008.10.010>
- Griesler, P. C., & Kandel, D. B. (1998). The impact of maternal drinking during and after pregnancy on the drinking of adolescent offspring. *Journal of Studies on Alcohol*, 59(3), 292–304. <https://doi.org/10.15288/jsa.1998.59.292>
- Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). THE TASTE REACTIVITY TEST. I. MIMETIC RESPONSES TO GUSTATORY STIMULI IN NEUROLOGICALLY NORMAL RATS. *Brain Research*, 143, 263–279.
- Groome, L. J., Ph, D., Gotlieb, S. J., Ph, D., Neely, C. L., & Waters, M. D. (1993). Developmental trends in fetal habituation to vibroacoustic stimulation. *American Journal of Perinatology*, 10(1).
- Gruet, N., Richer, P., & Hars, B. (2004). Emergence of Long-Term Memory for Conditioned Aversion in the Rat Fetus. *Developmental Psychobiology*, 44(3), 189–198.
<https://doi.org/10.1002/dev.20004>
- Guerri, C. (1995). Teratogenic effects of alcohol: current status on animal research and in vitro models. *Toxicology Letters*, 78(S1), 6–7.

- Guerri, Consuelo, & Sanchis, R. (1985). Acetaldehyde and alcohol levels in pregnant rats and their fetuses. *Alcohol*, 2(2), 267–270. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(85\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0741-8329(85)90057-6)
- Hahn, C.-Y., Huang, S.-Y., Ko, H.-C., Hsieh, C.-H., Lee, I.-H., Yeh, T.-L., Yang, Y.-K., Lee, J.-F., Lin, W.-W. & Lu, R.-B. (2006). Acetaldehyde involvement in positive and negative alcohol expectancies in han Chinese persons with alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, 63(7), 817–823. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.7.817>
- Hall, W. G., & Bryan, T. E. (1981). The ontogeny of feeding in rats: IV. Taste development as measured by intake and behavioral responses to oral infusions of sucrose and quinine. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 95(2), 240–251. <https://doi.org/10.1037/h0077771>
- Hall, W. G., & Oppenheim, R. W. (1987). Developmental Psychobiology: Prenatal, Perinatal, And Early Postnatal Aspects Of Behavioral Development. *Annual Review of Psychology*, 38(1), 91–128. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.38.1.91>
- Hamby-Mason, R., Chen, J. J., Schenker, S., Perez, a, & Henderson, G. I. (1997). Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 21(6), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb04255.x>
- Hannigan, J. H., Chiodo, L. M., Sokol, R. J., Janisse, J., & Delaney-Black, V. (2015). Prenatal alcohol exposure selectively enhances young adult perceived pleasantness of alcohol odors. *Physiology and Behavior*, 148, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.01.019>
- Hayashi, M. (1991). Ethanol and acetaldehyde concentrations in pregnant rats after administration of ethanol. *Japanese Journal of Alcohol Studies & Drug Dependence*, 26(2), 89–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1854287>

- Hayashi, M., Shimazaki, Y., Kamata, S., Kakiichi, N., & Ikeda, M. (1991). Disposition of ethanol and acetaldehyde in maternal blood, fetal blood, and amniotic fluid of near-term pregnant rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 184–189.
<https://doi.org/10.1007/BF01688638>
- Heit, C., Eriksson, P., Thompson, D. C., Charkoftaki, G., Fritz, K. S., & Vasiliou, V. (2016). Quantification of Neural Ethanol and Acetaldehyde Using Headspace GC-MS. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(9), 1825–1831.
<https://doi.org/10.1111/acer.13156>
- Heller, M., & Burd, L. (2014). Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 100(4), 277–283.
<https://doi.org/10.1002/bdra.23232>
- Hepper, P. G., Scott, D., & Shahidullah, S. (1993). Newborn and fetal response to maternal voice. *Journal of Reproductive and Infant Psychology*, 11(3), 147–153.
<https://doi.org/10.1080/02646839308403210>
- Hepper, P. G., Wells, D. L., Millsopp, S., Kraehenbuehl, K., Lyn, S. A., & Mauroux, O. (2012). Prenatal and early sucking influences on dietary preference in newborn, weaning, and young adult cats. *Chemical Senses*, 37(8), 755–766.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjs062>
- Hepper, P. G. (1988). Adaptative fetal learning: Prenatal exposure to garlic affects postnatal preferences. *Animal Behaviour*, 36(3), 935–936.
- Hilakivi, L., Tuomisto, L., Hilakivi, I., Kiianmaa, K., Hellevuo, K., & Hyytiä, P. (1987). Effect of prenatal alcohol exposure on neonatal sleep-wake behaviour and adult alcohol consumption in the AA and ANA rat lines. *Alcohol and Alcoholism*, 22(3), 231–240.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a044703>
- Hipolito, L., Sanchez, M., Polache, A., & Granero, L. (2007). Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update. *Current Drug Metabolism*, 8(7), 716–727.

<https://doi.org/10.2174/138920007782109797>

Hoffmann, D., Hoffmann, I., & El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology*, *14*(7), 767–790. <https://doi.org/10.1021/tx000260u>

Hoffmann, H., & Spear, N. E. (1989). Facilitation and impairment of conditioning in the preweanling rat after prior exposure to the conditioned stimulus. *Animal Learning & Behavior*, *17*(1), 63–69. <https://doi.org/10.3758/BF03205213>

Jones, B. M., & Jones, M. K. (1976). Alcohol Effects in Women During the Menstrual Cycle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *273*(1), 576–587. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb52931.x>

Kable, J. A., & Mukherjee, R. A. S. (2017). Neurodevelopmental disorder associated with prenatal exposure to alcohol (ND-PAE): A proposed diagnostic method of capturing the neurocognitive phenotype of FASD. *European Journal of Medical Genetics*, *6*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.09.013>

Kable, J. A., Taddeo, E., Strickland, D., & Coles, C. D. (2015). Community translation of the Math Interactive Learning Experience Program for children with FASD. *Research in Developmental Disabilities*, *39*, 1–11.

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*(4), 606–612. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01439.x>

Kim, S.-W., Bae, K.-Y., Shin, H.-Y., Kim, J.-M., Shin, I.-S., Youn, T., Kim, J., Kim, J.-K. & Yoon, J.-S. (2010). The Role of Acetaldehyde in Human Psychomotor Function: A Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Study. *Biological Psychiatry*, *67*(9), 840–845. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.10.005>

Korthank, A. J., & Robinson, S. R. (1998). Effects of amniotic

- fluid on opioid activity and fetal responses to chemosensory stimuli. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 33(3), 235–248.
- Kozlov, A. P., Petrov, E. S., Kashinsky, W., Nizhnikov, M. E., & Spear, N. E. (2003). Oral Compression Activity on a Surrogate Nipple in the Newborn Rat: Nutritive and Nonnutritive Sucking. *Developmental Psychobiology*, 43(4), 290–303. <https://doi.org/10.1002/dev.10145>
- Kristal, M. B. (1991). Enhancement of opioid-mediated analgesia: a solution to the enigma of placentophagia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15(3), 425–435.
- Kristal, M. B., Thompson, A. C., Abbott, P., Di Pirro, J. M., Ferguson, E. J., & Doerr, J. C. (1990). Amniotic-fluid ingestion by parturient rats enhances pregnancy-mediated analgesia. *Life Sciences*, 46(10), 693–698.
- Kutcher, E. O., Egorov, A. Y., & Chernikova, N. A. (2016). Early social isolation increases alcohol preference in experiment. *ZH. Nevrol. Psihiatr. Im. S. S. Korsakova*, 116(4), 52–57.
- Lemoine, D. (1968). Les enfants de parents alcooliques Anomalies, observees de 127 cas. *Quest. Medical*, 25, 477–482.
- Lemoine, P., Harousseau, H., Borteyru, J. P., & Menuet, J. C. (2003). Children of alcoholic parents observed anomalies: Discussion of 127 cases. *Therapeutic Drug Monitoring*, 25(2), 132–136. <https://doi.org/10.1097/00007691-200304000-00002>
- Lev, R., & Orlic, D. (1971). Protein Absorption by the Intestine of the Fetal Rat in Utero. *Science*, 177, 522–524.
- Liley, A. W. (1972). The foetus as a personality. *Australasian Psychiatry*, 6(2), 99–105. <https://doi.org/10.3109/00048677209159688>
- Lopez, M. F., Doremus-Fitzwater, T. L., & Becker, H. C. (2011). Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce later elevated ethanol intake in

- adult C57BL/6J mice. *Alcohol*, 45(4), 355–364.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.08.017>
- Lorenzo, P., Ladero, J. M., Leza, J. C., & Lizasoain, I. (1999). *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*. Editorial medica panamericana.
- Lui, S., Jones, R. L., Robinson, N. J., Greenwood, S. L., Aplin, J. D., & Tower, C. L. (2014). Detrimental effects of ethanol and its metabolite acetaldehyde, on first trimester human placental cell turnover and function. *PLoS ONE*, 9(2), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087328>
- Mao, J., Ma, H., Xu, Y., Su, Y., Zhu, H., Wang, R., Lin, F., Quing, H., & Deng, Y. (2013). Increased levels of monoamine-derived potential neurotoxins in fetal rat brain exposed to ethanol. *Neurochemical Research*, 38(2), 356–363.
<https://doi.org/10.1007/s11064-012-0926-7>
- March, S.M., Abate, P., & Molina, J. (2011). Prenatal Association between a Chemosensory Cue (Cineole) and Ethanol Postabsortive Effects Modulates Later Operant Responsiveness to Cineole-Flavored Milk in 1 Day Old Rats. *Revista Argentina de Ciencias Del Comportamiento*, 3(2), 12–18. <https://doi.org/10.32348/1852.4206.v3.n2.5224>
- March, S. M., Abate, P., & Molina, J. C. (2013). Acetaldehyde involvement in ethanol's postabsortive effects during early ontogeny. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(June), 70. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00070>
- Mbiene, J. P., & Farbman, A. I. (1993). Evidence for stimulus access to taste cells and nerves during development: An electron microscopic study. *Microscopy Research and Technique*, 26(2), 94–105.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070260203>
- Mei Feng, X., Ostenfeld Larsen, T., & Schnürer, J. (2007). Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 133–141.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.025>
- Mello, N. K., Mendelson, J. H., & Teoh, S. K. (1993). An overview

- of the effects of alcohol on neuroendocrine function in women. *Alcohol and the Endocrine System. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph, 93*, 139–169.
- Méndez-Gallardo, V., & Robinson, S. R. (2010). Opioid mediation of amniotic fluid effects on chemosensory responsiveness in the neonatal rat. *Developmental Psychobiology, 52*(8), 740–754.
<https://doi.org/10.1002/dev.20469>
- Mennella, J. A., & Beauchamp, G. K. (1998). Early flavor experiences: Research update. *Nutrition Reviews, 56*(7), 205–211. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01749.x>
- Mennella, J. A., Jagnow, C. P., & Beauchamp, G. K. (2001). Prenatal and Postnatal Flavor Learning by Human Infants. *Pediatrics, 107*(6), e88–e88.
<https://doi.org/10.1542/peds.107.6.e88>
- Mennella, J. A. (1997). Infants' Suckling Responses to the Flavor of Alcohol in Mothers' Milk. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 21*(4), 581–585.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03806.x>
- Mennella, J. A., & Beauchamp, G. K. (1998). Infants' exploration of scented toys: Effects of prior experiences. *Chemical Senses, 23*(1), 11–17.
<https://doi.org/10.1093/chemse/23.1.11>
- Mickley, G. A., Hoxha, Z., Disorbo, A., Wilson, G. N., Remus, J. L., Biesan, O., Ketchesin, K. D., Ramos, L., Luchsinger, J. R., Prodan, S., Rogers, M., Wiles, N. R. & Hoxha, N. (2013). Latent inhibition of a conditioned taste aversion in fetal rats. *Developmental Psychobiology, 56*(3), 435–447.
<https://doi.org/10.1002/dev.21110>
- Mickley, G. A., Remmers–Roeber, D. R., Crouse, C., Walker, C., & Dengler, C. (2000). Detection of novelty by perinatal rats. *Physiology and Behavior, 70*(3–4), 217–225.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00229-8)
- Miranda-Morales, R. S., Molina, J. C., Spear, N. E., & Abate, P. (2010). Participation of the endogenous opioid system in

- the acquisition of a prenatal ethanol-related memory: Effects on neonatal and preweanling responsiveness to ethanol. *Physiology and Behavior*, *101*(1), 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.033>
- Mistretta, C. M., & Bradley, R. M. (1986). Development of the Sense of Taste. In E. M. Blass (Ed.), *Developmental Psychobiology and Developmental Neurobiology* (pp. 205–236). Boston, MA: Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2113-2_6
- Miyake, T., & Shibamoto, T. (1993). Quantitative Analysis of Acetaldehyde in Foods and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(11), 1968–1970.
<https://doi.org/10.1021/jf00035a028>
- Molina-Martínez, L. M., & Juárez, J. (2020). Differential expression of μ -opioid receptors in the nucleus accumbens, amygdala and VTA depends on liking for alcohol, chronic alcohol intake and estradiol treatment. *Behavioural Brain Research*, *378*(September 2019), 112255.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112255>
- Molina, J. C., Chotro, M. G., & Spear, N. E. (1989). Early (preweanling) recognition of alcohol's orosensory cues resulting from acute ethanol intoxication. *Behavioral and Neural Biology*, *51*(3), 307–325.
[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(89\)90961-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(89)90961-8)
- Moon, C. M., & Fifer, W. P. (2000). Evidence of Transnatal Auditory Learning. *Journal of Perinatology*, *20*, S37–S44.
<https://doi.org/10.1038/sj.jp.7200448>
- Mooney, S. M., & Varlinskaya, E. I. (2018). Enhanced sensitivity to socially facilitating and anxiolytic effects of ethanol in adolescent Sprague Dawley rats following acute prenatal ethanol exposure. *Alcohol*, *69*, 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.11.002>
- Moreno, M. A. (2017). Prenatal alcohol exposure: no safe amount. *JAMA Pediatrics*, *171*(8), 820.
- Moreno, S., Mugnaini, E., & Cerú, P. (1995). Immunocytochemical Localization of Catalase in the Central Nervous System of the Rat. *The Journal of*

- Histochemistry and Cytochemistry*, 43(12), 1253–1267.
- Morillas, E., González, F., & Hall, G. (2019). Facilitation and retardation of flavor preference conditioning following prior exposure to the flavor conditioned stimulus. *Learning and behavior*, 47(2), 177-186.
- Morokuma, S., Doria, V., Ierullo, A., Kinukawa, N., Fukushima, K., Nakano, H., Arulkumaran, S. & Papageorghiou, A. T. (2008). Developmental change in fetal response to repeated low-intensity sound. *Developmental Science*, 11(1), 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2007.00646.x>
- Narayanan, C. H., Fox, M. W., & Hamburger, V. (1971). Prenatal development of spontaneous evoked activity in the rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Behaviour*, 40(1/2), 100–134.
- Nash, F. J., & Maickel, R. P. (1985). Stress-induced consumption of ethanol by rats. *Life Sciences*, 37(8), 757–765.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) - Fetal Alcohol Exposure. June 2021.
- Nava-Ocampo, A. A., Velázquez-Armenta, Y., Brien, J. F., & Koren, G. (2004). Elimination kinetics of ethanol in pregnant women. *Reproductive Toxicology*, 18(4), 613–617. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.02.012>
- Nelson, L. R., Lewis, J. W., Liebeskind, J. C., Branch, B. J., & Taylor, A. N. (1983). Stress induced changes in ethanol consumption in adult rats exposed to ethanol in utero. In *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (Vol. 26, pp. 205–209).
- Nizhnikov, M. E., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2007). Central reinforcing effects of ethanol are blocked by catalase inhibition. *Alcohol*, 41(7), 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2007.08.006>
- Nizhnikov, M. E., Molina, J. C., Varlinskaya, E. I., & Spear, N. E. (2006). Prenatal ethanol exposure increases ethanol reinforcement in neonatal rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(1), 34–45. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00009.x>

- Nizhnikov, M. E., Pautassi, R. M., Carter, J. M., Landin, J. D., Varlinskaya, E. I., Bordner, K. A., Werner, D. F. & Spear, N. E. (2014). Brief prenatal ethanol exposure alters behavioral sensitivity to the kappa opioid receptor agonist (U62,066E) and antagonist (Nor-BNI) and reduces kappa opioid receptor expression. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(6), 1630–1638.
<https://doi.org/10.1111/acer.12416>
- Nizhnikov, M. E., Popoola, D. O., & Cameron, N. M. (2016). Transgenerational transmission of the effect of gestational ethanol exposure on ethanol use-related behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(3), 497–506.
- O'Brien, J. W., & Hill, S. Y. (2014). Effects of Prenatal Alcohol and Cigarette Exposure on Offspring Substance Use in Multiplex, Alcohol-Dependent Families. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(12), 2952–2961.
<https://doi.org/10.1111/acer.12569>
- O'Keeffe, L. M., Kearney, P. M., McCarthy, F. P., Khashan, A. S., Greene, R. A., North, R. A., Poston, L., McCowan, L. M. E., Baker, P. N., Dekker, G. A., Walker, J. J., Taylor, R. y Kenny, L. C. (2015). Prevalence and predictors of alcohol use during pregnancy: Findings from international multicentre cohort studies. *BMJ Open*, 5(7), 1–11.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006323>
- Oostindjer, M., Bolhuis, J. E., Van Den Brand, H., Roura, E., & Kemp, B. (2010). Prenatal flavor exposure affects growth, health and behavior of newly weaned piglets. *Physiology & Behavior*, 99(5), 579–586.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.031>
- Parker, L. A. (1995). Rewarding drugs produce taste avoidance, but not taste aversion. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 19(1), 143–151. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00028-Y](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00028-Y)
- Parker, L. A., & Carvell, T. (1986). Orofacial and somatic responses elicited by lithium-, nicotine- and amphetamine-paired sucrose solution. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(4), 883–887.

[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90431-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90431-4)

- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., & Spear, N. E. (2009). Assessing appetitive, aversive, and negative ethanol-mediated reinforcement through an immature rat model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *33*(6), 953–974. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.03.008>
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., & Spear, N. E. (2011). Ethanol-mediated appetitive conditioning in infant rats, but not corticosterone release, is dependent on route of ethanol administration. *Developmental Psychobiology*, *54*(1), 98–104. <https://doi.org/10.1002/dev.20567>
- Peana, A. T., Enrico, P., Assaretti, A. R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M., Piga, A., Lintas, A., & Diana, M. (2008). Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: A conditioned place preference study in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *32*(2), 249–258. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00574.x>
- Pedersen, D. R., Panter, S. S., & Collins, A. C. (1977). Ethanol and acetaldehyde metabolism in the pregnant mouse. *Drug and Alcohol Dependence*, *2*, 409–420.
- Pedersen, P. E., & Blass, E. M. (1982). Determinants of the 1st Suckling Episode in Albino Rats. *Developmental Psychobiology*, *15*(September 1981), 349–355.
- Pedersen, P. E., Greer, C. A., & Shepherd, G. M. (1986). Early Development of Olfactory Function. In E. M. Blass (Ed.), *Developmental Psychobiology and Developmental Neurobiology* (pp. 163–203). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2113-2_5
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I., & Spear, N. E. (2003). Reinforcement From Pharmacological Effects of Ethanol in Newborn Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *27*(10), 1583–1591. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000089960.62640.58>
- Polańska, K., Jurewicz, J., & Hanke, W. (2015). Smoking and alcohol drinking during pregnancy as the risk factors for poor child neurodevelopment. *International Journal of*

- Occupational Medicine and Environmental Health*, 28(3), 419–443. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00424>
- Popoola, D. O., Borrow, A. P., Sanders, J. E., Nizhnikov, M. E., & Cameron, N. M. (2015). Can low-level ethanol exposure during pregnancy influence maternal care? An investigation using two strains of rat across two generations. *Physiology & Behavior*, 148, 111–121.
- Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., & Rehm, J. (2017). Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 5(3), e290–e299. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9)
- Prasad, C., & Prasad, A. (1995). A relationship between increased voluntary alcohol preference and basal hypercorticotestosterone associated with an attenuated rise in corticosterone output during stress. *Alcohol*, 12(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(94\)00070-T](https://doi.org/10.1016/0741-8329(94)00070-T)
- Quertemont, E., & Didone, V. (2006). Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 29(4), 258–265.
- Quertemont, E., & Tambour, S. (2004). Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(3), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.01.001>
- Quertemont, E., Tambour, S., & Tirelli, E. (2005). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Progress in Neurobiology*, 75(4), 247–274. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.03.003>
- Randich, A., & LoLordo, V. M. (1979). Associative and nonassociative theories of the UCS preexposure phenomenon: Implications for Pavlovian conditioning. *Psychological Bulletin*, 86(3), 523–548. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.3.523>

- Rausgaard, N. L. K., Ibsen, I. O., Jørgensen, J. S., Lamont, R. F., & Ravn, P. (2015). Prevalence of substance abuse in pregnancy among Danish women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *94*(2), 215–219. <https://doi.org/10.1111/aogs.12528>
- Redila, V. A., Smith, B. R., & Amit, Z. (2000). The effects of aminotriazole and acetaldehyde on an ethanol drug discrimination with a conditioned taste aversion procedure. *Alcohol*, *21*(3), 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(00\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(00)00096-3)
- Revillo, D. A., Arias, C., & Spear, N. E. (2013). The unconditioned stimulus pre-exposure effect in preweanling rats in taste aversion learning: Role of the training context and injection cues. *Developmental Psychobiology*, *55*(2), 193–204. <https://doi.org/10.1002/dev.21011>
- Riley, A. L., & Simpson, G. R. (2001). The attenuating effects of drug preexposure on taste aversion conditioning: Generality, experimental parameters, underlying mechanisms, and implications for drug use and abuse.
- Robertson, S. S., & Bacher, L. F. (1995). Oscillation and chaos in fetal motor activity. In *Fetal development: A psychobiological perspective*. (pp. 169–189). Hillsdale, NJ, US: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.
- Robertson, S. S., & Smotherman, W. P. (1990). The neural control of cyclic motor activity in the fetal rat (*Rattus norvegicus*). *Physiology and Behavior*, *47*(1), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90049-A](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90049-A)
- Robinson, S. R., & Méndez-Gallardo, V. (2010). *Amniotic fluid as an extended milieu intérieur*. *Handbook of Developmental Science, Behavior, and Genetics*. <https://doi.org/10.1002/9781444327632.ch9>
- Sanchis-Segura, C., Miquel, M., Correa, M., & Aragon, C. M. G. (1999). The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. *Alcohol*, *19*(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00016-6)
- Sanchis, R., & Guerri, C. (1986). Alcohol-Metabolizing Enzymes in Placenta and Fetal Liver: Effect of Chronic Ethanol

- Intake. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 10(1), 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1986.tb05611.x>
- Sarkola, T., Iles, M. R., KohlenbergMueller, K., & Eriksson, C. P. (2002). Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4methylpyrazole. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(2), 239–245.
- Schaal, B., Marlier, L., & Soussignan, R. (2000). Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chemical Senses*, 25(6), 729–737. <https://doi.org/10.1093/chemse/25.6.729>
- Serrano, E., J. Pozo, O., Beltrán, J., Hernández, F., Font, L., Miquel, M., & M.G. Aragón, C. (2007). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of (4S,2RS)-2,5,5-trimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, a stable adduct formed between D-(–)-penicillamine and acetaldehyde (main biological metabolite of ethanol), in plasma, liver and brain. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 21, 1221–1229. <https://doi.org/10.1002/rcm2951>
- Shen, R. Y., Hannigan, J. H., & Kapatos, G. (1999). Prenatal ethanol reduces the activity of adult midbrain dopamine neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(11), 1801–1807. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1999.tb04076.x>
- Sherrill, L. K., Berthold, C., Koss, W. A., Juraska, J. M., & Gulley, J. M. (2011). Sex differences in the effects of ethanol pre-exposure during adolescence on ethanol-induced conditioned taste aversion in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 225(1), 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.003>
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., & Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, 79(2), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.005>

- Sinclair, J. D., & Lindros, K. O. (1981). Suppression of alcohol drinking with brain aldehyde dehydrogenase inhibition. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *14*(3), 377–383. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90405-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90405-6)
- Smok, C., Roa, I., & Rojas, M. (2014). Desarrollo Fetal Mamíferos. *Int. J. Medi. Surg. Sci.*, *1*(2), 139–145.
- Smotherman, W. P. (1982). In utero chemosensory experience alters taste preferences and corticosterone responsiveness. *Behavioral and Neural Biology*, *36*(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(82\)90245-X](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(82)90245-X)
- Smotherman, W. P. (2002a). Classical conditioning in the rat fetus: Involvement of mu and kappa opioid systems in the conditioned response. *Developmental Psychobiology*, *40*(2), 104–115. <https://doi.org/10.1002/dev.10016>
- Smotherman, W. P. (2002b). Classical conditioning in the rat fetus: Temporal characteristics and behavioral correlates of the conditioned response. *Developmental Psychobiology*, *40*(2), 116–130. <https://doi.org/10.1002/dev.10017>
- Smotherman, W. P., Arnold, H. M., & Robinson, S. R. (1993). Responses to ecologically relevant stimuli in the rat fetus: Interactive effects of milk and an artificial nipple. *Developmental Psychobiology*, *26*(6), 359–374. <https://doi.org/10.1002/dev.420260606>
- Smotherman, W. P., & Robinson, S. R. (1985). The rat fetus in its environment: behavioral adjustments to novel, familiar, aversive, and conditioned stimuli presented in utero. *Behavioral Neuroscience*, *99*(3), 521–530. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.99.3.521>
- Smotherman, W. P., & Robinson, S. R. (1988). Behavior of rat fetuses following chemical or tactile stimulation. *Behavioral Neuroscience*, *102*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.102.1.24>
- Smotherman, W. P., & Robinson, S. R. (1995). Dopamine D1 and D2 effects on fetal mouthing responses to milk. *Physiology & Behavior*, *57*(1), 15–19.

- Smotherman, W. P., Robinson, S. R., & Robertson, S. S. (1988). Cyclic motor activity in the fetal rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *102*(1), 78–82. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90049-A](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90049-A)
- Spear, L. P., Specht, S. M., Kirstein, C. L., & Kuhn, C. M. (1989). Anterior and posterior, but not cheek, intraoral cannulation procedures elevate serum corticosterone levels in neonatal rat pups. *Developmental Psychobiology*, *22*(4), 401–411. <https://doi.org/10.1002/dev.420220407>
- Spear, N. E., & Molina, J. C. (2005). Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: A theoretical review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *29*(6), 909–929. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000171046.78556.66>
- Spelt, D. K. (1948). The conditioning of the human fetus in utero. *Journal of Experimental Psychology*, *38*(3), 338–346. <https://doi.org/10.1037/h0059632>
- Spivak, K., Aragon, C. M., & Amit, Z. (1987a). Alterations in brain aldehyde dehydrogenase activity modify ethanol-induced conditioned taste aversion. *Alcohol Clin Exp Res*, *11*(6), 513–517.
- Spivak, K., Aragon, C. M., & Amit, Z. (1987b). Alterations in brain aldehyde dehydrogenase activity modify the locomotor effects produced by ethanol in rats. *Alcohol and Drug Research*, *7*(5–6), 481–491. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/3620014>
- Sreenathan, R. N., Padmanabhan, R., & Singh, S. (1982). Teratogenic effects of acetaldehyde in the rat. *Drug and Alcohol Dependence*, *9*, 339–350.
- Stickrod, G., Kimble, D. P., & Smotherman, W. P. (1982). In utero taste/odor aversion conditioning in the rat. *Physiology and Behavior*, *28*(1), 5–7. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90093-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90093-2)
- Streissguth, A. (2007). Offspring effects of prenatal alcohol exposure from birth to 25 years: The Seattle prospective longitudinal study. *Journal of Clinical Psychology in Medical Settings*, *14*(2), 81–101. <https://doi.org/10.1007/s10880->

007-9067-6

- Streissguth, A. P., Martin, D. C., Martin, J. C., & Barr, H. M. (1981). The Seattle longitudinal prospective study on alcohol and pregnancy. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 3(2), 223–233. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7254467>
- Streissguth, A. P., Barr, H. M., & Martin, D. C. (1983). Maternal Alcohol Use and Neonatal Habituation Assessed with the Brazelton Scale. *Child Development*, 54(5), 1109–1118.
- Streissguth, A. P., Landesman-Dwyer, S., Martin, J. C., & Smith, D. W. (1980). Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science*, 209(18), 353–361. <https://doi.org/10.1097/00006254-198101000-00006>
- Stromberg, M. F., Volpicelli, J. R., & O'Brien, C. P. (1998). Effects of naltrexone administered repeatedly across 30 or 60 days on ethanol consumption using a limited access procedure in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(9), 2186–2191. <https://doi.org/10.1097/00000374-199812000-00039>
- Szeto, H. H. (1989). Maternal-Fetal Pharmacokinetics and Fetal Dose-Response Relationships. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 562(1), 42–55. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb21006.x>
- Tabakoff, B., Anderson, R. A., & Ritzmann, R. F. (1976). Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochemical Pharmacology*, 25(11), 1305–1309. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(76\)90094-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(76)90094-0)
- Tambour, S., & Quertemont, E. (2007). Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21(1), 9–28.
- Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1976). Suckling in Newborn Rats: Eliminated by Nipple Lavage, Reinstated by Pup Saliva. *Science*, 193(4251), 422–425.
- Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1977). First suckling response of the newborn albino rat: The roles of olfaction and amniotic fluid. *Science*, 198(4317), 635–636.

<https://doi.org/10.1126/science.918660>

- Thackray, H. M., & Tiffet, C. (2001). Fetal Alcohol Syndrome, 22(2).
- Tuma, D. J., & Casey, C. A. (2003). Dangerous byproducts of alcohol breakdown - Focus on adducts. *Alcohol Research and Health*, 27(4), 285–290.
- Unadkat, J., Dahlin, A., & Vijay, S. (2005). Placental Drug Transporters. *Current Drug Metabolism*, 5(1), 125–131. <https://doi.org/10.2174/1389200043489171>
- Van Heteren, C. F., Boekkooi, P. F., Schiphorst, R. H. M., Jongsma, H. W., & Nijhuis, J. G. (2001). Fetal habituation to vibroacoustic stimulation in uncomplicated postterm pregnancies. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 97(2), 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00543-1](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00543-1)
- Van Thiel, D. H. (1983). Ethanol: its adverse effects upon the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 101(1), 21–33.
- Vigorito, M., & Sclafani, A. (1988). Ontogeny of polycose and sucrose appetite in neonatal rats. *Developmental Psychobiology*, 21(5), 457–465. <https://doi.org/10.1002/dev.420210505>
- Vind, C., & Grunnet, N. (1987). Rate determining factors of ethanol oxidation in hepatocytes from starved and fed rats: effect of acetaldehyde concentration on the rate of NADH oxidation catalyzed by alcohol dehydrogenase. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement*, 1, 295–299.
- Wall, T. L., Thomasson, H. R., Schuckit, M. A., & Ehlers, C. L. (1992). Subjective Feelings of Alcohol Intoxication in Asians with Genetic Variations of ALDH2 Alleles. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 16(5), 991–995. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01907.x>
- Warren, K. R., & Murray, M. M. (2013). Alcohol and pregnancy: fetal alcohol spectrum disorders and the fetal alcohol syndrome. *Alcohol: Science, Policy and Public Health*, 307.

- Webster, W. S., Walsh, D. A., McEwen, S. E., & Lipson, A. H. (1983). Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: Implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology*, *27*(2), 231–243. <https://doi.org/10.1002/tera.1420270211>
- Wells, D. L., & Hepper, P. G. (2006). Prenatal olfactory learning in the domestic dog. *Animal Behaviour*, *72*(3), 681–686. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.12.008>
- Wille-Bille, A., Bellia, F., Jiménez García, A. M., Miranda-Morales, R. S., D'Addario, C., & Pautassi, R. M. (2020). Early exposure to environmental enrichment modulates the effects of prenatal ethanol exposure upon opioid gene expression and adolescent ethanol intake. *Neuropharmacology*, *165*(165), 107917. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107917>
- Xie, G., Hipólito, L., Zuo, W., Polache, A., Granero, L., Krnjević, K., & Ye, J. H. (2012). Salsolinol stimulates dopamine neurons in slices of posterior ventral tegmental area indirectly by activating μ -opioid receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *341*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.186833>
- Yates, W. R., Cadoret, R. J., Troughton, E. P., Stewart, M., & Giunta, T. S. (1998). Effect of fetal alcohol exposure on adult symptoms of nicotine, alcohol, and drug dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, *22*(4), 914–920. <https://doi.org/00000374-199806000-00023> [pii]
- Youngentob, S. L., Kent, P. F., & Youngentob, L. M. (2012). Gestational naltrexone ameliorates fetal ethanol exposures enhancing effect on the postnatal behavioral and neural response to ethanol. *Experimental Biology and Medicine*, *237*(10), 1197–1208. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012132>
- Zakhari, S. (2006). Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research and Health*, *29*(4), 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1959.tb17304.x>
- Zimatkin, S. M. (1991). Histochemical Study of Aldehyde Dehydrogenase in the Rat CNS. *Journal of Neurochemistry*,

- 56(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02555.x>
- Zimatkin, S. M. (2013). General commentary to the paper “acetaldehyde involvement of ethanol in postabsorptive effects during early ontogeny” by S. M. March, P. Abate and J. C. Molina. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(JUN), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00075>
- Zimatkin, S. M., & Lindros, K. O. (1996). Distribution of catalase in rat brain: Aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol and Alcoholism*, 31(2), 167–174. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008128>
- Zimatkin, S. M., Liopo, A. V., & Deitrich, R. A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(8), 1623–1627. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03958.x>
- Zimatkin, S. M., & Lis, R. E. (1990). The activity of aldehyde dehydrogenase in the developing brain. *Archiv Anatomii, Gistologii i Embriologii*, 5.
- Zimatkin, S. M., Pronko, S. P., Vasiliou, V., Gonzalez, F. J., & Deitrich, R. A. (2006). Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(9), 1500–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00181.x>
- Zorzano, A., & Herrera, E. (1989a). Decreased in Vivo Rate of Ethanol Metabolism in the Suckling Rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 13(4), 527–532. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1989.tb00372.x>
- Zorzano, A., & Herrera, E. (1989b). Disposition of ethanol and acetaldehyde in late pregnant rats and their fetuses. *Pediatric Research*, 25(1), 102–106. <https://doi.org/10.1203/00006450-198901000-00022>