

## **MECANISMOS NEUROENZIMÁTICOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LAS CONDUCTAS INDUCIDAS POR ETANOL: EL PAPEL DE LA CATALASA ENCEFÁLICA.**

Esta tesis aborda el estudio de los mecanismos de acción del etanol sobre el Sistema Nervioso y sobre las conductas inducidas por etanol. En concreto, se encuadra dentro de la investigación sobre los enzimas implicados en el metabolismo del alcohol, particularmente a aquellos implicados en la producción del acetaldehído. La actividad de la catalasa encefálica puede tener una función en los efectos neuro y psicofarmacológicos del etanol. Así, se han presentado datos demostrando que la inhibición de la catalasa encefálica *in vivo* e *in vitro* reduce la producción de acetaldehído. Sin embargo, la implicación de la catalasa en las acciones del etanol ha sido cuestionada por el empleo casi exclusivo de un inhibidor como herramienta farmacológica. Hasta el presente trabajo sólo a nivel bioquímico había sido utilizada la potenciación de la actividad de la catalasa para demostrar el aumento en la producción de acetaldehído. Por ello, la presente tesis doctoral subsana esta cuestión, utilizando la administración aguda del plomo como inductor de la actividad de la catalasa y demostrando que varias conductas inducidas por etanol se ven también potenciadas, indicando con ello de manera indirecta que el acetaldehído media algunas de las conductas que se le atribuyen al etanol.

## **NEUROENZYMATIC MECHANISMS INVOLVED IN THE REGULATION OF ETHANOL-INDUCED BEHAVIORS: THE ROLE OF BRAIN CATALASE.**

The present work propose that brain enzymatic systems plays a role in the modulation of some psychopharmacological effects of ethanol. The acute administration of lead acetate has demonstrated a transient increase in several antioxidant cell mechanisms, including among other enzymes, catalase. In the present study, we investigated the effects of acute lead acetate administration on ethanol-induced behavior, brain catalase activity and the relation between both effects. In summary, the present findings seem to support the notion that cerebral catalase may be involved in ethanol-induced behavioral effects. This putative role of the enzyme catalase in some of the psychopharmacological effects of ethanol may be

through its ability to produce acetaldehyde in the central nervous system and this capacity exerts at least some influence on ethanol-induced behaviors. Thus, acetaldehyde produced inside the central nervous system via catalase seems to be an interesting candidate in order to elucidate the mechanisms of action of ethanol.

*A mis padres y hermano.*

*A Enrique.*

## ***AGRADECIMIENTOS.***

Son muchas las personas que han colaborado en el desarrollo de esta tesis. Aunque, sin duda, les debo mucho más, espero que estas pocas palabras sirvan para mostrarles mi reconocimiento.

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi director de Tesis Dr. Carlos G. Aragón por su dedicación y esfuerzo constantes. Sus enseñanzas y consejos, no sólo a nivel profesional sino también personal, han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Durante este tiempo me ha enseñado, no sólo los procedimientos más básicos de esta disciplina sino sobretodo, ha conseguido transmitirme una visión de la ciencia, que va más allá de la obtención de datos, y la ilusión por trabajar en investigación. Aprecio en gran medida lo que ello supone para la evolución de mi vida profesional.

A la Dra. Marta Miquel, con la que he colaborado desde los inicios de este laboratorio. Sus consejos y su inestimable ayuda en los diferentes procesos por los que ha pasado esta tesis, han hecho que ésta sea posible. Con ella también he aprendido la parte más estimulante de la docencia en estas disciplinas.

A Carles Sanchis, por compartir conmigo los buenos, pero también los malos ratos pasados en el laboratorio. Sus ideas y su ayuda han sido siempre una buena razón para seguir trabajando.

Una gran parte de mis conocimientos en el campo en que se inscribe esta tesis los he aprendido en las gratas reuniones y seminarios de trabajo que los cuatro hemos mantenido a lo largo de los últimos años. Pero sobre todo, valoro en ellos el apoyo y la amistad que me han brindado siempre.

Muchas otras personas han contribuido de un modo diferente al buen término de este trabajo. De entre ellas quiero destacar a María, Chelo, Sandra y Cristina, pero especialmente, a Mari Carmen Ventura por su dedicación en el cuidado de los animales y por su ayuda técnica sin la cual todo el trabajo en el laboratorio sería mucho más complicado.

Al equipo de Química Analítica de la Universitat Jaume I, en especial a Félix Hernandez y a Toni Roig, por su importante aportación en la determinación de las

concentraciones de plomo en cerebro. También al equipo de Biología Vegetal de la Universitat Jaume I, en especial a Pilar García, por su ayuda técnica y consejos en los análisis bioquímicos.

Finalmente, quisiera dar las gracias a muchos compañeros/as y amigos/as que con sus consejos y estima me han dado el apoyo y la ilusión para continuar trabajando. Entre ellos a los muchos amigos de Ciencias Experimentales, de Química Inorgánica y Orgánica y a la gente de los cineforums y excursiones por los buenos ratos pasados en común. A Núria, Raül y Bea.

Especialmente, a ti Enrique, gracias por estar a mi lado y por compartirlo todo conmigo.

A mis padres y mi hermano que han soportado el proceso largo y costoso de esta tesis, animándome siempre a seguir y apoyándome en mis opciones profesionales y personales. Su ayuda y cariño han sido fundamentales para mi todo este tiempo.

# ***INDICE.***

## **Prefacio.**

### **MARCO TEORICO.**

## **CAPITULO 1. El Alcohol: Una droga sin receptor.....1**

1.1. El alcohol como sustancia de abuso .....	1
1.2. Neuropsicofarmacología del etanol.....	2
Efectos del etanol en la membrana neuronal.....	2
Efectos del etanol en la neurotransmisión.....	4
1.3. Metabolismo del etanol: La hipótesis del acetaldehído.....	10
Interacción del acetaldehído con el sustrato neural .....	12
Efectos conductuales del acetaldehído .....	13
1.4. Sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo central del etanol .....	15
Alcohol Deshidrogenasa .....	16
Sistema Microsomal de Monooxigenasas (MEOS) .....	16
Catalasa .....	17
1.5. El sistema catalasa-peróxido de hidrógeno y los radicales libres .....	18
Caracterización de la catalasa.....	18
El oxígeno y las especies reactivas de oxígeno .....	19
Producción intracelular de peróxido de hidrógeno.....	21
1.6. El papel de la catalasa en el mecanismo de acción del etanol en el SNC ...	23
Metabolismo central del etanol a través de la catalasa.....	24
Catalasa y conducta inducida por etanol .....	26
Otras herramientas farmacológicas: El plomo .....	31

## **CAPITULO 2. Farmacología del Plomo. .... 33**

2.1. Farmacocinética .....	33
----------------------------	----

Distribución del plomo en el organismo .....	34
2.2. Mecanismos de acción.....	36
<b>CAPITULO 3. Evidencia experimental de la interacción Etanol- Plomo.....</b>	<b>41</b>
3.1. Estudios bioquímicos y fisiológicos.....	42
3.2. Estudios conductuales.....	47

### **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

<b>CAPITULO 4. Objetivos.....</b>	<b>55</b>
4.1. Objetivo General .....	55
4.2. Objetivos Concretos .....	56
4.3. Plan de Trabajo .....	57
<b>CAPITULO 5. Fases experimentales.....</b>	<b>61</b>
FASE EXPERIMENTAL I .....	63
Efecto de una administración aguda de acetato de plomo en la actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la catalasa encefálica.	

FASE EXPERIMENTAL II.....	101
Especificidad del efecto de una administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol.	
FASE EXPERIMENTAL III.....	119
Efecto del inhibidor de la catalasa 3-amino-1,2,4-triazole en interacción con la administración aguda de acetato de plomo.	
FASE EXPERIMENTAL IV.....	141
Administración crónica de acetato de plomo: Efectos en la actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la catalasa encefálica.	
FASE EXPERIMENTAL V.....	163
Modulación de la actividad de la catalasa y efecto en la narcosis inducida por etanol.	
<b>CAPITULO 6. Discusión y conclusiones generales.....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>203</b>
<b>APENDICES.....</b>	<b>223</b>



## ***PREFACIO.***

El trabajo que aquí presentamos se enmarca dentro de la Farmacología de la Conducta. El objeto de estudio de esta disciplina se centra en el análisis de los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos que median los procesos conductuales.

En concreto, este estudio muestra como la manipulación de la actividad del enzima cerebral catalasa provoca cambios específicamente en las conductas inducidas por etanol. Los resultados se interpretan en el marco teórico del acetaldehído, producido en el SNC, como agente mediador de algunos efectos conductuales del etanol.

En el presente estudio hemos utilizado metodología conductual para abordar el estudio de las interacciones farmacológicas entre sustancias con efectos sobre el Sistema Nervioso Central. En el diseño experimental optamos por la Actividad Locomotora y por la Narcosis como índices conductuales por tratarse de dos efectos opuestos: uno estimulante y otro depresor. Además el registro de ambas conductas es objetivo y fácil de realizar.

El desarrollo de este trabajo nos permitirá examinar la interacción plomo-etanol. El plomo, como herramienta farmacológica, es de especial interés por su capacidad para inducir los enzimas antioxidantes, entre ellos, la catalasa. La estrategia que planteamos, por tanto, es novedosa dentro de los tradicionales estudios sobre el tema, dado que en ninguno de ellos se aplica un inductor de la catalasa para estudiar su efecto en las conductas inducidas por etanol.

El plomo además resulta especialmente idóneo para nuestros propósitos porque su efecto sobre la catalasa es opuesto en función de la manera en que es administrado: agudo vs. crónico. Por ello, una parte de este trabajo muestra su efecto inhibitor sobre la catalasa y sobre las conductas inducidas por etanol. La demostración de la interacción plomo crónico- etanol supondría apoyar los datos obtenidos en otros laboratorios con otros paradigmas conductuales en los cuales, el plomo antagoniza alguno de los efectos producidos por el etanol.

La presente Tesis Doctoral se divide esencialmente en dos partes. En la primera de ellas hacemos una revisión de los conocimientos teóricos actuales acerca de la interacción del etanol con el substrato neural. Planteamos la situación del etanol como

"molécula sin receptor" y mostramos las alternativas sugeridas hasta el momento en relación a los mecanismos de acción, haciendo especial énfasis en la propuesta del metabolismo central del etanol y con ello del acetaldehído como sustancia implicada en los efectos psicoestimulantes del etanol.

También en la parte teórica introducimos una revisión general del plomo como sustancia de conocidas repercusiones sobre el organismo, pero especialmente como agente que moviliza los sistemas de defensa antioxidantes de la célula y con ellos al enzima catalasa. Exponemos los datos que otros estudios han ido aportando hasta el momento, tanto desde el aspecto farmacológico como desde los efectos sobre la conducta.

En la segunda parte se desarrolla el trabajo experimental. Este trabajo experimental ha sido dividido en 5 partes que tratan de mantener una coherencia estructural en las preguntas a resolver. En cada uno de ellos aparecen los planteamientos teóricos concretos de los que se parte, así como las hipótesis y objetivos, la metodología experimental utilizada y los resultados obtenidos. Finalmente se discuten los hallazgos a la luz de la literatura existente.

Por último, al final del trabajo se pueden encontrar las referencias bibliográficas y un apéndice que contiene las tablas con los análisis estadísticos de los datos obtenidos.

# ***MARCO TEORICO***

## ***CAPITULO 1.***

### ***EL ALCOHOL: UNA DROGA SIN RECEPTOR.***

#### **1.1. El alcohol como sustancia de abuso.**

La cuestión acerca de por qué consumimos drogas podría traducirse en cómo diferentes sustancias pueden generar recompensa y refuerzo, consumo y dependencia y convertirse en adictivas. Una de las hipótesis de mayor aceptación se basa en la consideración de las drogas como "**moléculas oportunistas**" que ocupan receptores y circuitos destinados a otros compuestos endógenos. Éstos son los mediadores de procesos motivacionales vinculados a los estados emocionales básicos. Así, el cambio de los agentes químicos que median dicho proceso y la variación en las respuestas conductuales necesarias para obtenerlos, se traducen en un cambio en las motivaciones que guían la conducta individual.

En el caso del etanol, numerosos estudios han intentado determinar las estructuras cerebrales y bioquímicas que podrían mediar el efecto positivo reforzante de este alcohol. Se han descrito efectos del etanol sobre diferentes estructuras del sistema nervioso central (SNC) y cada uno de ellos se ha presentado en algún momento de la historia científica reciente como el responsable del consumo de bebidas alcohólicas. Sin embargo, lo cierto es que ninguno de estos efectos parece ser capaz de explicar la conducta inducida por etanol de forma totalmente convincente. Los datos parecen indicar un importante papel para los sistemas mesolímbicos y mesocorticales dopaminérgicos (IMPERATO y DI CHIARA, 1986; MCBRIDE y cols., 1991; KATNER y cols., 1996). No obstante, esta idea no ha conseguido aún una aceptación general y es posible que otras regiones cerebrales y neurotransmisores estén implicados en este proceso (HUNT, 1993).

El etanol es una molécula muy simple y por ello presenta ciertas dificultades para ajustarse a la hipótesis de las drogas como moléculas oportunistas dado que no se ha encontrado, hasta la fecha, un receptor específico para esta sustancia en el SNC, a

diferencia de otras drogas de abuso. No en vano muchos autores han llegado a hablar del etanol como una **droga sin receptor** (TABAKOFF y HOFFMAN, 1987).

Pasamos a exponer en el siguiente apartado un resumen de algunos de los efectos del etanol sobre los niveles molecular y celular, y en cómo estos se traducen en modificaciones conductuales.

## **1.2. Neuropsicofarmacología del etanol.**

### **Efectos del etanol en la membrana neuronal.**

Una de las primeras propuestas apareció en 1901 cuando Meyer y Overton describieron la similitud existente entre muchas acciones de los alcoholes y las de los anestésicos generales. Esta similitud llevó a los autores a formular la llamada "hipótesis de la membrana". Esta dejaba de lado los efectos estimulantes del etanol y se centraba en la descripción de las perturbaciones morfológicas que sobre la bicapa lipídica originaban alcoholes y anestésicos, y cómo éstas se traducían en manifestaciones conductuales depresoras (narcosis, incoordinación motora, etc) comunes para ambos tipos de compuestos (BLOOM, 1991).

La hipótesis de la membrana ha sido apoyada por diferentes pruebas. Así, en experiencias de administración aguda, se ha comprobado mediante estudios con EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) que concentraciones fisiológicas de etanol de entre 25 y 100 mM incrementan la fluidez de las membranas. También mediante EPR se ha evidenciado que el grado en la alteración de las membranas correlaciona con el tiempo de narcosis inducida por etanol, tanto en animales seleccionados por dicha característica (*short/long sleep*), como en estirpes heterogéneas (HUNT, 1985; TABAKOFF y HOFFMAN, 1987).

En administraciones crónicas de etanol se ha observado la aparición de tolerancia a la fluidificación de las membranas inducida por el etanol. Este fenómeno de adaptación se produce en ratones tras 8 ó 9 días de administración forzada, y se hallan relacionados con una mayor proporción de moléculas de cortisol en las membranas evaluadas (HUNT, 1985; OLLAT y cols., 1988). Sin embargo, estos cambios en la membrana aparecidos tras el consumo crónico de alcohol no presentan una correlación temporal con la aparición de las variaciones conductuales descritas como tolerancia

para un gran número de paradigmas experimentales, por lo que parece difícil poder relacionar ambos fenómenos (GOLDSTEIN, 1987).

Por otra parte, actualmente existe un gran número de pruebas que señalan cómo los procesos de consumo de drogas están netamente influidos por fenómenos de aprendizaje (condicionamiento) y otras funciones complejas que son difícilmente compatibles con un mecanismo de acción basado en la mera alteración de las membranas celulares. Muchos autores (TABAKOFF y HOFFMAN, 1987) rechazan la hipótesis de la membrana por estar basada en un mecanismo de acción muy general.

Por todo lo anterior, la acción del etanol como causante de una alteración generalizada de la bicapa lipídica es cada vez menos admitida como un posible mecanismo explicativo de los efectos conductuales observados. Ello ha propiciado la aparición de nuevas teorías que intentan incorporar esta interacción etanol-membrana pero desde una perspectiva diferente.

Una de las alternativas de mayor difusión ha sido la consideración de que pueden existir interacciones entre el etanol y ciertas estructuras proteicas de las membranas, tales como canales, bombas iónicas o receptores. A diferencia de lo propuesto por Meyer y Overton, se sugiere que el etanol no realizaría una acción general sobre la membrana, sino que actuaría de forma localizada, debido a variaciones en el grado de afinidad por determinadas estructuras de membrana.

Algunas pruebas en favor de la existencia de **microdominios** en la membrana celular han aparecido tras la observación de que los gangliósidos que contienen ácido siálico son especialmente sensibles al efecto de alteración inducido por etanol (OLLAT y cols., 1988) y que la administración aguda de éstos puede antagonizar algunos de los efectos conductuales observados para el etanol (KLEMM y cols., 1988).

De este modo, es posible que diferentes estructuras de membrana puedan poseer una afectación distinta ante el alcohol. Por todo ello ha cobrado gran interés la evaluación del funcionamiento de los distintos tipos de enzimas, bombas y canales en presencia de esta sustancia, asumiendo que todas aquellas acciones que acaben produciendo algún efecto en la neurotransmisión pueden formar parte del mecanismo de acción del etanol.

### **Efectos del etanol en la neurotransmisión.**

En los sinaptosomas se ha constatado la capacidad del alcohol para poder reducir la actividad de la  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasa. Estos efectos presentan una adaptación descrita como tolerancia cuando el tratamiento se prolonga durante cinco o seis días. Otra proteína que parece ser afectada por el etanol es la monoamina oxidasa (MAO), aunque parece que sólo en su isoforma B es inhibida (TABAKOFF y HOFFMAN, 1987). Esta selectividad, traducida en la capacidad de actuar diferencialmente sobre dos moléculas tan similares, supone un nuevo indicio de que los efectos del etanol no son generales sino muy específicos.

Por otra parte, también los **segundos mensajeros** se ven afectados por la presencia del etanol. Se ha podido constatar que administraciones agudas de etanol provocan una reducción de la liberación de fosfolípidos estimulada por los receptores muscarínicos tipo 1 (M1) sin que haya podido repetirse este efecto para otros receptores evaluados (adrenérgicos, por ejemplo). Por otra parte, se ha comprobado que una sola administración de etanol es capaz de reducir la concentración de GMPc en el encéfalo al producir una disminución dosis-dependiente de la síntesis de este nucleótido inducida por receptores histaminérgicos y muscarínicos (OLLAT y cols., 1988).

Más estudiado ha sido el AMPc, aunque ello no siempre se ha traducido en una mayor claridad de las conclusiones. En general, en experiencias de exposición aguda, se describen inhibiciones de este nucleótido seguidas de regulaciones al alza si se cronifica la presencia de etanol. Un efecto del etanol es su capacidad para inhibir la fosforilación intracelular dependiente de kinasas en determinadas proteínas, tales como el DARP-32, la tirosín-hidroxilasa, la sinapsina 1, diferentes canales proteicos e incluso la propia autofosforilación del AMPc (ORTIZ y cols., 1995; NESTLER y cols., 1996). Un interés adicional por este tipo de acción viene dado por la regionalización de los efectos encontrados entre el córtex y el estriado, correspondiéndose a poblaciones neuronales adrenérgicas y dopaminérgicas respectivamente.

En cuanto a los efectos del etanol sobre canales iónicos dependientes de voltaje, se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, la capacidad de éste para reducir el transporte de los iones de calcio a través de la membrana, al tiempo que facilita la exocitosis  $\text{K}^+$ dependiente del contenido de calcio en el medio intracelular (HUNT, 1985). Este es un efecto reversible y dependiente de la concentración de etanol. Además se ha constatado que la administración crónica de etanol provoca un aumento en el número de canales L de calcio y un consecuente aumento en la liberación de

dopamina (HUNT, 1993). Por otra parte, y aunque se ha constatado que el etanol puede interferir en el flujo iónico de los canales de sodio, en este caso no parecen estar tan claras las consecuencias que pueda tener sobre la actividad eléctrica de las neuronas ni en la liberación de neurotransmisores (OLLAT y cols., 1988).

Aunque el etanol es una molécula muy simple y ello parece limitar su posible especificidad a un tipo de receptor neural, la interacción del etanol con las moléculas receptoras y los **sistemas de neurotransmisión clásicos** han sido muy estudiadas, obteniéndose resultados muy dispares.

Los canales dependientes de ligando han ocupado especialmente la atención de los neurobiólogos, ya que estos substratos pueden poner en relación el etanol con dos de los sistemas de neurotransmisión principales, el mediado por el ácido- $\gamma$ -butírico (GABA) y el ligado al glutamato. El interés por el **GABA** nace posiblemente de los efectos ansiolíticos compartidos entre benzodiazepinas y etanol. No obstante, aunque existen pruebas claras de interacciones moleculares complejas entre el canal de cloro ligado al GABA y el etanol, éstas sólo han podido ser parcialmente relacionadas con cambios conductuales (convulsiones, incoordinación motora, etc.) poco relevantes de cara a la explicación de conductas motivadas inducidas por etanol (MORROW y cols., 1988).

Respecto al **glutamato**, el canal catiónico dependiente de ligando NMDA ha ocupado la mayor parte de las investigaciones. Existen numerosos indicios que sugieren acciones del etanol en diferentes puntos del receptor NMDA. Así, en general, se ha descrito una inhibición de los movimientos iónicos ligados a este receptor tras una administración aguda de etanol, mientras que la exposición crónica parece inducir un incremento del número de receptores glutámicos (HUNT, 1993). No obstante, de forma similar a lo dicho para el GABA, los efectos conductuales que dichos cambios moleculares provocan, parecen ir ligados a fenómenos (daño neural, síndrome de retirada, etc.) que pueden ser poco importantes de cara a la explicación de la ingesta de alcohol (TABAKOFF y cols., 1991).

En cuanto a la **acetilcolina** en interacción con el etanol, los resultados son muy dispares. *In vitro*, el etanol parece incapaz de alterar la liberación de este neurotransmisor así como el ligamiento de agonistas colinérgicos (HUNT, 1985). Sin embargo, *in vivo* se ha constatado que el etanol es capaz de incrementar la respuesta excitatoria de neuronas piramidales colinérgicas en el hipocampo tras la administración de etanol (MANCILLAS y cols., 1986). A nivel conductual se ha demostrado como



diferentes antagonistas muscarínicos, como la escopolamina, son capaces de detener la ingesta de etanol en ratones (HO y TSAI, 1975) y en ratas (REZVANI y cols., 1991). Asimismo se ha evidenciado una respuesta diferente en la actividad locomotora inducida por nicotina en ratas seleccionadas por sus niveles de consumo de etanol (KATNER y cols., 1996).

Las **catecolaminas** han sido, posiblemente, los neurotransmisores más estudiados en la conducta inducida por etanol. En muchas ocasiones, se ha propuesto a la **dopamina** como el principal agente químico implicado en la recompensa y el refuerzo producido por el alcohol y otras drogas (WISE y ROMPRE, 1989), aunque aún no se ha podido establecer con exactitud el rol que ésta pueda jugar. A estas dificultades teóricas se añade el hecho de que tanto los agonistas como los antagonistas de la dopamina producen un descenso en el consumo de etanol (PULVIRENTI y KASTIN, 1988; PULVIRENTI y KOOB, 1994). Por todo ello, aunque la dopamina y algunos de sus circuitos son, sin duda, uno de los substratos más estudiados en las investigaciones sobre la recompensa, el refuerzo y la adicción, aún no se ha podido establecer con claridad el rol que éste juega en dichos procesos (KIYATKIN, 1995) y en menor medida en relación al etanol.

La **noradrenalina** ha sido muy estudiada en relación al etanol, especialmente durante la década pasada. Este interés deriva del descubrimiento de la posibilidad de reducir el consumo voluntario de etanol mediante el uso de inhibidores de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (AMIT y cols., 1976; BROWN y cols., 1977), así como por la demostración de que el etanol altera niveles de actividad noradrenérgica, pudiendo establecerse adecuadas correlaciones entre ésta y los niveles séricos del primero (SMITH y cols., 1985a). En cualquier caso, este interés por la NA ha decaído notablemente en la actualidad y son pocos los autores que la presentan como un componente principal de los mecanismos de acción implicados en el control del consumo voluntario del etanol.

La **serotonina** ha sido también ampliamente estudiada por parte de los neurobiólogos de la conducta del etanol. No obstante, aunque múltiples han sido las manipulaciones genéticas y farmacológicas evaluadas, se desconoce aún que papel puede jugar esta amina en el control del consumo voluntario del alcohol. La principal dificultad para resolver dicha cuestión deriva de que, al igual de lo comentado para la dopamina, tanto compuestos de efectos agonistas como antagonistas de este neurotransmisor tienden a reducir el consumo oral de etanol (MYERS, 1994). Los estudios de lesión de vías serotoninérgicas tampoco han podido zanjar esta cuestión. La

búsqueda de nuevas herramientas que permitan manipular los niveles de serotonina están siendo estudiados en la actualidad, dedicándole especial atención a los inhibidores selectivos de la recaptación de esta amina (LEJOYEUX, 1996).

Finalmente, mencionar que en relación a la serotonina y la dopamina también se ha planteado la posibilidad de que pudieran formar junto con el etanol (o sus metabolitos), algún compuesto (BECK y cols., 1995) capaz de interactuar con algún receptor del SNC.

En las dos últimas décadas ha existido un interés creciente por los llamados neuropéptidos en prácticamente todos los campos de la neurobiología. En este sentido, la investigación de los posibles mecanismos de acción en el SNC no ha sido ajena a dicha preocupación habiéndose abordado las relaciones entre ambos compuestos en repetidas ocasiones. Sin duda, una de las familias peptidérgicas que se han estudiado en mayor medida (al menos en relación con el etanol) son los llamados **opiáceos endógenos**.

Existe gran cantidad de trabajos que intentan relacionar este sistema y el refuerzo y recompensa inducidos por etanol (VAN REE, 1996; GIANOULAKIS y cols., 1996; TERENIUS, 1996; HERTZ, 1997). Sin embargo, las manipulaciones realizadas sobre este sistema parecen afectar gran variedad de conductas motivadas. Este hecho ha sido considerado por algunos autores (WEISS y KOOB, 1991) como una evidencia de que los opiáceos endógenos, más que mediar un mecanismo de acción de los efectos psicofarmacológicos de diferentes drogas de abuso, formarían parte de un sistema general de control de la conducta consumatoria.

Por otra parte, tras administraciones agudas de etanol, no se han encontrado, en condiciones que pudieran ser fisiológicamente relevantes, cambios en las tasas de ligamiento de diferentes agonistas de estos péptidos o en el funcionamiento de sus receptores. No obstante, la evidencia de cambios en diferentes parámetros de actividad del sistema de opiáceos endógenos tras una exposición crónica al etanol o bajo ciertas condiciones experimentales, obliga a iniciar nuevos estudios que permitan dilucidar de forma clara la relación entre ambos (DEITRICH y cols., 1989).

Estudios recientes sugieren que algunos de los efectos del etanol pueden estar mediados por el tripéptido **neurotensina** (ERWIN y DEITRICH, 1996). Gran cantidad de índices sugieren que este compuesto actúa como un verdadero neurotransmisor, con receptores específicos colocalizados con los principales tractos dopaminérgicos

(ERWIN y DEITRICH, 1996). Por otra parte, se ha constatado el agonismo entre neurotensina y etanol en algunos paradigmas (hipotermia, narcosis, etc.) y el paralelismo en la sensibilidad a los efectos de la neurotensina en estirpes seleccionadas por su respuesta al etanol (*Low/high sensitivity*).

La **angiotensina** también ha sido implicada en la ingesta de alcohol, habiéndose constatado una relación bidireccional entre ambos. Por una parte, en lo referido a las manipulaciones (genéticas, farmacológicas, etc.) de este sistema peptidérgico podemos afirmar que todas aquellas que inducen el funcionamiento de este sistema reducen el consumo de etanol, mientras que el resultado inverso se obtiene tras intervenciones que reducen los niveles de angiotensina o de su actividad. Por otra parte, se ha constatado que el consumo de etanol aumenta los niveles de angiotensina. Tomando estos datos en conjunto, algunos autores han propuesto la implicación de este neuropéptido en algún tipo de mecanismo de saciedad en el consumo de etanol (GRUPP, 1991). Así, aunque prometedor, el papel de la angiotensina requiere de nuevos estudios en que se aborde su especificidad, su posible implicación en otros efectos del etanol y, especialmente, el mecanismo de acción por el cual produce estos efectos.

Por otra parte existe una serie de estudios que indican algún tipo de implicación de las prostaglandinas en los efectos depresores del etanol. Así pues, inhibidores de la síntesis de éstos producen una reducción del tiempo de narcosis y la letalidad inducidas por dosis altas de alcohol en diferentes estirpes de ratones (COLLINS y cols., 1985). Por otra parte, la administración de etanol eleva los niveles cerebrales de estos compuestos endógenos con un patrón dosis dependiente (COLLINS y cols., 1985).

Resultados similares se han hallado al evaluar las relaciones entre **adenosina** y etanol. Es decir, diferentes paradigmas conductuales que evalúan los efectos depresores y disreguladores (incoordinación motora, por ejemplo) del alcohol, presentan un sinergismo con agonistas de la adenosina. Asimismo se ha constatado que estirpes de ratones que difieren en su sensibilidad a algunos efectos del etanol lo hacen (*short /long sleep*) también, en su respuesta a drogas cuyo mecanismo de acción está ligado a la adenosina. Además, a nivel molecular se ha constatado que los niveles de acetato producidos por el metabolismo del etanol (1-2 mM) proporcionan substrato suficiente para posibilitar una síntesis de adenosina sobreelevada, al tiempo que la presencia del etanol es capaz de inhibir la recaptación purinérgica (NAGY y cols., 1990). Estos y otros informes que describen nuevas formas de interacción entre el etanol y este péptido han hecho que éste sea un tema de gran dinamismo en la actualidad (DUNWIDDIE y DIAO, 1994). En cualquier caso, los efectos subjetivos de recompensa y reforzamiento

mediante pruebas de discriminación no han podido ser relacionados hasta la fecha con esta sustancia, por lo que parece poco probable que pueda llegar a revelarse como el mecanismo de acción que controla el consumo voluntario de alcohol (DEITRICH y cols., 1989).

En resumen, aunque se ha intentado encontrar una acción del etanol sobre la mayor parte de los neurotransmisores y gran cantidad de neuromoduladores, no se ha podido constatar ninguna capaz de explicar de forma satisfactoria cómo éste genera la recompensa y el refuerzo capaces de explicar el consumo de etanol y conductas relacionadas. Por lo tanto, la imposibilidad de obtener conclusiones claras, junto a lo obvio de sus efectos en el SNC y, consecuentemente, en la conducta, ha llevado a muchos investigadores a plantearse alternativas, principalmente centradas en la existencia de algún tipo de transformación (**metabolismo**) del etanol. Esto supondría un cambio de sus propiedades moleculares posibilitando nuevas alternativas de interacción con el substrato neural. De este modo cuando hablamos de "conducta inducida por etanol" en realidad estaríamos refiriéndonos a los efectos producidos por elementos distintos de la cadena metabólica de dicha sustancia, cada uno de los cuales podría tener mecanismos de acción diferentes.

Así por ejemplo, algunos autores (CARMICHAEL y cols., 1991; ISRAEL y cols., 1994) han descrito que la depresión de la actividad locomotora inducida por la administración de dosis elevadas de etanol (y/o por el mero paso del tiempo) podrían responder a la actuación de un sistema de acetato-adenosina que fuera independiente de la activación que provoca el propio etanol. En favor de estos supuestos obrarían los datos que señalan la independencia genotípica entre la sensibilidad a la activación y la depresión inducida por este alcohol (DRASKI y DEITRICH, 1996). En cualquier caso, aunque sí existen algunos indicios en esta línea, la delimitación precisa de una correspondencia entre los efectos del etanol y los agentes químicos (el etanol o sus metabolitos) que provocan directamente dichos efectos, actualmente, es sólo una atractiva posibilidad.

### 1.3. Metabolismo del etanol: La hipótesis del acetaldehído.

El etanol se metaboliza fundamentalmente por oxidación, transformándose en acetaldehído. En las situaciones de consumo oral (las más habituales) este proceso acontece principalmente en el **hígado** y se halla fundamentalmente mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (alcohol: NAD-oxidoreductasa, EC 1.1.1.1) (PETERSEN y cols., 1983). Esta enzima cataliza la conversión reversible de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas utilizando NAD (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido) como cofactor:



En los seres humanos, pero también en roedores, la ADH es un sistema que implica muchos genes y alelos que dan lugar a diferentes subtipos de enzimas.

Existen también, otros dos sistemas enzimáticos hepáticos que posibilitan esta misma reacción y que adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema principal. Estos dos sistemas son el llamado sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno (Compuesto I).

Así para algunos autores, el MEOS es un sistema que contribuye en escasa medida al metabolismo del etanol, tanto en presencia como en ausencia de ADH, cifrando (a nivel agudo) dicha contribución entre un 3 y un 8% respectivamente. Pero, cuando los datos se refieren a los niveles de eliminación de etanol tras un tratamiento crónico, estos valores alcanzan hasta el 22%. (THURMAN y HANDLER, 1989).

Por contra, otros autores han señalado que las contribuciones de la catalasa al metabolismo del etanol pueden verse seriamente comprometidas ya que los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en el organismo podrían ser insuficientes para posibilitar el nivel de funcionamiento que algunos autores le atribuyen. Por ello se reclama una mayor importancia para el MEOS de la que tradicionalmente se le ha venido dando (LIEBER y DeCARLI, 1970; TECHSKE y cols. 1976; ITO y LIEBER, 1993). No obstante, existen pruebas que indican que los niveles de peróxido de hidrógeno presentes en algunas mediciones *in vitro* pueden ser menores de los existentes *in vivo* lo que podría estar reduciendo la importancia percibida de la vía metabólica mediada por la catalasa. Así, la adición de ácidos grasos o albúmina (que elevan la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a estas preparaciones, posibilita que este sistema devenga el principal responsable de la oxidación del etanol en ausencia de la ADH (HANDLER

y THURMAN, 1985; 1990). De forma paralela, se encuentran datos que señalan cambios en el metabolismo hepático del etanol (independientes de la ADH) cuando los animales reciben una dieta rica en carbohidratos (KEEGAN y NATEY, 1993).

En el segundo paso el acetaldehído es metabolizado a acetato principalmente por la aldehído deshidrogenasa (ALDH; EC 1.2.1.3) hepática.

Asimismo, existen una evidencia clara de la existencia de un metabolismo extrahepático del etanol en diferentes órganos corporales tales como el corazón, el estómago (SALMELA y cols., 1996; PARES, 1996), los riñones (DeMASTER y cols., 1986) y el cerebro (COHEN y cols., 1980). Este metabolismo está mediado por uno o más de los sistemas enzimáticos localizados en el hígado, aunque la predominancia entre ellos en cada tejido está aún en fase de estudio.

Tradicionalmente, el acetaldehído acumulado en el organismo ha sido implicado en los efectos aversivos que produce el etanol (alteraciones cardíacas, náuseas, dolores de cabeza, etc.) (CHAO, 1995). De este postulado se derivan la mayoría de las terapias farmacológicas utilizadas para combatir el alcoholismo, que tratan de impedir el metabolismo hepático del acetaldehído administrando inhibidores de la ALDH como el disulfirán y la cianamida.

Junto a los efectos tóxicos del acetaldehído, cada vez va apareciendo un mayor *corpus* de trabajos encaminados a demostrar que este metabolito del etanol es también responsable de algunos de los efectos psicofarmacológicos que se le atribuyen al propio etanol (LINDROS, 1978; ARAGON, y cols., 1986; BERGAMASCHI y cols., 1988; CHAO, 1995; SMITH y cols., 1997; ZIMATKIN y DEITRICH, 1997).

La pregunta planteada, por tanto, es si el acetaldehído puede por sí mismo producir algún efecto en el SNC que resulte en cambios de conducta capaces, en última instancia, de explicar el consumo del alcohol.

### **Interacción del acetaldehído con el substrato neural.**

Se ha demostrado la capacidad del acetaldehído para promover diferentes efectos en los sistemas clásicos de neurotransmisión así como en los mediados por neuropéptidos. Así, en estudios de cultivos de neuronas se han constatado cambios en las tasas de ligamiento de diferentes subtipos de receptores GABAérgicos, NMDA y acetilcolina (KURIYAMA y cols., 1987).

Por otra parte, hace más de dos décadas que se demostró la capacidad del acetaldehído para promover la liberación de noradrenalina en terminales del sistema nervioso periférico (WALSH, 1971). y en el SNC (THADANI y TRUITT, 1977). Resultados similares a los referidos para la noradrenalina, se han constado para la serotonina y la dopamina (ORTIZ y cols., 1974). Respecto a esta última, se ha observado que el acetaldehído mimetiza, aunque con mayor velocidad, el incremento de DOPAC inducido por etanol en el estriado (BARBACCIA y cols., 1982).

Respecto a los neuropéptidos, se ha demostrado que el acetaldehído es capaz de promover la liberación de  $\beta$ -endorfinas en cultivos celulares hipotalámicos (PASTORIC y cols., 1994). Este efecto es también producido por el etanol pero no por otros alcoholes, aunque para las mismas dosis (12.5-50  $\mu$ M) el efecto obtenido es menor (REDDY y cols., 1993; 1995). Este dato resulta aún de mayor interés por cuanto diferentes autores han intentado poner en relación el reforzamiento y la recompensa de diferentes sustancias de abuso (entre ellas el alcohol/acetaldehído) con las  $\beta$ -endorfinas (GIANOULAKIS y cols., 1996) así como con otros péptidos del sistema de opiáceos endógenos (TERENIUS, 1996).

### **Efectos conductuales del acetaldehído.**

El **condicionamiento aversivo de sabor (CAS)** es un paradigma que se evidencia en todas las drogas capaces de mostrar algún efecto de recompensa, así como con sustancias y procedimientos aversivos (como la administración de cloruro de litio o de un shock eléctrico). No obstante, para muchos autores (HUNT y AMIT, 1987) el substrato por el cual se logra el CAS puede ser distinto en ambos casos, incluso para una misma sustancia. El etanol es capaz de inducir CAS, pero este efecto bien pudiera deberse al acetaldehído más que al etanol. Por otra parte, en el supuesto de que el fenómeno estuviera mediado por el acetaldehído, podría responder tanto a factores reforzantes como aversivos. Los estudios realizados parecen demostrar que la

preexposición a acetaldehído es capaz de bloquear el condicionamiento aversivo al sabor inducido por etanol, y viceversa. Ahora bien, es posible que el acetaldehído sea más potente en este efecto de bloqueo ya que, incluso a dosis pequeñas de acetaldehído (0.2 g/kg), el efecto aparece con gran claridad, mientras que el etanol sólo consigue bloquear marginalmente el condicionamiento inducido por dosis mayores de acetaldehído (0.3 g/kg) (ARAGON y cols., 1986).

Estos datos sugieren un efecto dual del acetaldehído, dependiente de dosis, sustentado por dos mecanismos de acción distintos. Esta posibilidad se ve avalada por la capacidad del  $\alpha$ -para-metil-tirosina (AMPT) para bloquear sólo el CAS inducido por dosis pequeñas de acetaldehído, mostrándose totalmente inefectivo cuando las dosis aumentan (ARAGON y cols., 1991a). Dado que el AMPT es un inhibidor de la tirosín hidroxilasa (y como tal un inhibidor de la síntesis de catecolaminas) podemos pensar que en el primer caso (0.2 g/kg) el acetaldehído posee un efecto central, mientras que en el segundo (0.3 g/kg) el efecto es independiente del sistema catecolaminérgico, y posiblemente ligado a fenómenos periféricos de carácter aversivo.

Apoyando esta posible acción central del acetaldehído deben situarse aquellos informes que señalan la capacidad de inducir **preferencia de lugar** en ratas tras su administración intracerebroventricular (ICV) (SMITH y cols., 1984). Este paradigma, aunque no implica autoadministración (voluntariedad en la administración del acetaldehído), debe ser considerado como una medida de recompensa y reforzamiento en tanto que la presencia del acetaldehído (que actúa como un estímulo incondicionado apetitivo) posibilita una asociación pavloviana que se expresa en la elección de unas señales contextuales frente a otras.

Sin embargo, unas de las pruebas más directas de la implicación del acetaldehído en los efectos reforzantes del etanol son las aportadas por paradigmas en que se permite a los animales la **autoadministración** de acetaldehído, especialmente cuando ésta se realiza directamente en el SNC (ICV). En este sentido, se ha podido demostrar que las ratas aprenden a responder activamente (manipulando una palanca por ejemplo) para recibir pequeñas cantidades de acetaldehído en el encéfalo (BROWN y cols., 1979; 1980). En esta misma línea de experimentos, es importante señalar que algunos grupos de investigadores han mostrado que la autoadministración de acetaldehído por otras vías, como la intravenosa (IV) o la intraperitoneal (IP), también resulta reforzante (MYERS y cols., 1982; TAKAYAMA y UYENO, 1985) y aumenta el posterior consumo oral de etanol (MYERS y cols., 1984a,b).



No obstante, existen numerosas reticencias a aceptar la hipótesis del acetaldehído como agente responsable de algunos efectos conductuales del etanol, debido a los **problemas teóricos** que se plantean. El acetaldehído derivado del metabolismo periférico del etanol es difícilmente detectado en la sangre tras un consumo normal y el que se escapa del metabolismo hepático, penetra con dificultad de la sangre al cerebro debido a la presencia en la barrera hematoencefálica de una barrera metabólica presentada por la ALDH (ZIMATKIN, 1991; HUNT, 1996). Se necesitan altos niveles de acetaldehído en la sangre, incluso mayores de los encontrados tras un consumo muy elevado, para poder detectarlo en el fluido cerebroespinal o en tejido nervioso (TABAKOFF y cols., 1976; DEITRICH, 1987).

Es necesario destacar que, tras un consumo moderado o alto de etanol en ratas, los niveles de acetaldehído en sangre (10-100  $\mu\text{M}$ ) son mucho mayores que los detectados en el encéfalo (con un máximo de 15  $\mu\text{M}$ ). En esta misma línea Petersen y Tabakoff han calculado que, en situaciones en las que los niveles de acetaldehído en sangre se hallen próximos a 150  $\mu\text{M}$ , en el cerebro deben situarse entre 5 y 20  $\mu\text{M}$ . Siguiendo con estos cálculos, un nivel de 50  $\mu\text{M}$  en sangre supondría niveles encefálicos muy próximos a cero (PETERSEN y cols., 1983). También se han ensayado mediciones de acetaldehído en el líquido cefalorraquídeo (LCR) tanto de animales experimentales como humanos constatándose siempre valores muy bajos (entre 1 y 5  $\mu\text{M}$ ). Este tipo de resultados ha hecho que muchos autores desestimen el rol que el acetaldehído pueda jugar en los efectos psicofarmacológicos y reforzantes del etanol (LINDROS y HILLBOM, 1979). Sin embargo, aunque los niveles detectados de acetaldehído en cerebro son bajos o se detectan con dificultad, esto no supone pruebas concluyentes en contra de la hipótesis del acetaldehído, dado que los niveles necesarios, en principio, podrían ser tan bajos como los encontrados. Esta idea se ve parcialmente apoyada por la demostración de que niveles mucho menores de acetaldehído reproducen efectos encontrados para el etanol en actividad locomotora (HOLTZMAN y SCHNEIDER, 1974).

Este hecho pone de relieve una importante cuestión: Si el acetaldehído no puede atravesar, al menos en cantidades detectables, la barrera hematoencefálica, ¿cómo puede ser responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol?. A esta cuestión se le ha tratado de dar respuesta desde el planteamiento del **metabolismo del etanol en el propio SNC**. Es decir, el acetaldehído se formaría en el propio SNC a partir del etanol consumido por el organismo que alcanzase dicho sistema. Para ello, deberían encontrarse en el SNC los sistemas enzimáticos necesarios para posibilitar esta

transformación. Esta posibilidad salva el escollo planteado por las dificultad de paso a través de la barrera hematoencefálica del acetaldehído generado periféricamente por lo que parece una explicación alternativa plausible (AMIT y cols., 1986; ZIMATKIN y DEITRICH, 1997).

En el apartado siguiente pasamos a analizar las pruebas encaminadas a apoyar esta hipótesis: el metabolismo central del etanol como fuente de acetaldehído, molécula responsable de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

#### **1.4. Sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo central del etanol.**

Como hemos expuesto en apartados anteriores, la oxidación del etanol en humanos y otros animales se da en dos etapas y acontece principalmente en el hígado. A pesar de ello, existe la posibilidad de que junto al periférico, exista un metabolismo central (en el cerebro) del etanol. Esta posibilidad queda sustentada por la demostración de la existencia, en el SNC de diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el etanol.

En el caso del cerebro el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado y parece ser un tanto diferente. Así, se ha demostrado la existencia de alcohol deshidrogenasa (ADH) en el encéfalo (para una reciente revisión ver LANDS, 1998). También se ha podido hallar la presencia de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS, como el CYP450 (LANDS, 1998). Finalmente, existe un gran número de pruebas de que el sistema catalasa-peróxido de hidrógeno se halla presente y activo en el SNC (SMITH y cols., 1985b; ZIMATKIN y cols., 1998).

Junto a las mediadas por enzimas, existe una vía diferente que podría metabolizar el etanol en acetaldehído y que estaría mediada por la presencia de radicales libres procedentes de la autooxidación del ascorbato u otros substratos (ZIMATKIN y DEITRICH, 1997). En cualquier caso, existe una clara evidencia de que el consumo crónico de etanol produce un aumento en la producción de radicales libres que, cuando menos, parece estar claramente relacionado con fenómenos de toxicidad ligada a éste (MONTOLIU y cols., 1994). Además de esta, también existe una vía de metabolismo de etanol no oxidativa que se daría a través de la formación de ácidos grasos etil esterés y fosfatidiletanol (ZIMATKIN y DEITRICH, 1997).

Pasemos ahora a describir la aportación de los diferentes sistemas enzimáticos en el metabolismo central del etanol. Dado que la enzima catalasa es el eje central del presente trabajo, describiremos los datos hallados acerca de su implicación en el metabolismo cerebral del etanol con una mayor profusión en un apartado diferente.

### **Alcohol deshidrogenasa.**

La importancia relativa de los sistemas enzimáticos parece variar notablemente en el cerebro en relación al hígado. Así, la ADH I, que en el hígado es el principal oxidante del etanol a concentraciones bajas y moderadas, posee una muy limitada actuación en el SNC (RASKIN y SOKOLOFF, 1972). De hecho, no se ha podido demostrar la presencia de la isoforma I de ADH en cerebro (ver LANDS, 1998 para una reciente revisión). Fundamentalmente, en el cerebro de humanos y también en el de ratones, la isoforma más abundante de esta enzima es la clase III (ROUT, 1992). Sin embargo, esta isoforma tiene baja afinidad por el etanol y difícilmente es activada por éste ya que aún en severas intoxicaciones etílicas no se alcanzan las concentraciones necesarias para que su contribución sea relevante (GILL y cols., 1992).

### **Sistema Microsomal de Monoxigenasas (MEOS).**

El MEOS representa a una familia multigénica de hemoproteínas implicadas en la detoxificación o activación de compuestos endógenos y exógenos. En este sistema, el citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) parece ser el que se halla más implicado en el metabolismo del etanol y su presencia en el sistema nervioso se halla confirmada (NORRIS y cols., 1994). No obstante, parece que CYP 2E1 supone menos del 1% de los citocromos CYP450 contenidos en el MEOS, lo que parece reducir notablemente su contribución al metabolismo central del etanol (HUNT, 1996). No obstante, el hecho de que sea inducible tras la presencia crónica de etanol parece sugerir que puede tener algún papel en su metabolismo, especialmente en procesos crónicos (GILL y cols., 1992), aunque esta inducción ha sido asociada con la aceleración de la lipíperoxidación y posiblemente con los efectos tóxicos del etanol y la alteración de las membranas (MONTOLIU y cols., 1994).

Desafortunadamente, son muy pocos los estudios realizados sobre contribución específica que puedan tener el CYP 2E1 y el compuesto catalasa-peróxido de hidrógeno

en el metabolismo del etanol en el sistema nervioso central. Por contra, a nivel hepático esta cuestión ha sido objeto de debate durante mucho tiempo, aunque sin que se haya producido una determinación clara de qué enzimas y bajo qué circunstancias son responsables del metabolismo de este alcohol.

### **Catalasa.**

Con todo, en lo referido al sistema nervioso, la catalasa ha sido estudiada con mayor profundidad que el resto de alternativas. Estudios inmunohistoquímicos (ZIMATKIN y LINDROS, 1996) e inmunocitoquímicos (MORENO y cols., 1995) han puesto de relieve que la catalasa se sitúa fundamentalmente en los cuerpos de neuronas catecolaminérgicas del troncoencéfalo y también en ciertos tipos de glía de las mencionadas áreas, por tanto el número total de células neurales con alta concentración de catalasa (a los mismos niveles que en los hepatocitos) es muy pequeña en relación al total del cerebro. Esto explicaría los bajos niveles de actividad detectados en homogenados cerebrales (ARAGON y cols., 1992; GILL y cols., 1992b). Por otro lado, la localización de las neuronas que contienen alta densidad de catalasa contrasta notablemente con localizaciones previamente realizadas para la ALDH (ZIMATKIN y DEITRICH, 1995). Sin embargo, tomados en su conjunto, estos datos sugieren que aunque la cantidad total de acetaldehído que pueda producirse en el encéfalo a través de la catalasa sea pequeña, existe la posibilidad de que se produzcan acumulaciones de acetaldehído suficientes para provocar cambios en la fisiología y la actividad de determinados grupos neuronales. Además, al igual que ocurre para la catalasa (ARAGON y AMIT, 1985; ARAGON y cols., 1985b), los niveles de ALDH presentan una correlación significativa con los niveles de consumo voluntario de etanol de diferentes estirpes de ratas (AMIR, 1977; 1978a,b; SOCARANSKY y cols., 1984; 1985).

Tomando en consideración las pruebas existentes hasta el momento sobre el metabolismo cerebral del etanol, parece que ninguno de los sistemas que hemos presentado está ausente de problemas. Sin embargo, la catalasa sería el sistema enzimático con más apoyo experimental en su papel como mecanismo de síntesis de acetaldehído.

Por tanto, partiendo de la hipótesis de la catalasa como mediador del metabolismo cerebral del etanol, pasamos a exponer con mayor detalle como funciona este sistema

enzimático, para posteriormente comentar los resultados que otros trabajos han obtenido siguiendo esta hipótesis y cuales han sido las críticas con las que cuenta.

## 1.5. El sistema enzimático Catalasa-Peróxido de Hidrógeno y los Radicales Libres.

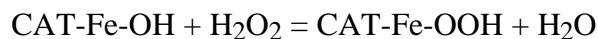
### Caracterización de la catalasa.

La acción de la catalasa en tejidos animales fue observada por primera vez en 1818 por Thenard, quien apreció que tales tejidos degradaban peróxido de hidrógeno. En 1901 Loew estableció que la degradación de  $H_2O_2$  en tejidos era debida a los efectos de una enzima individual y aislable a la que llamó "catalasa". Warburg en 1923 sugirió que la catalasa es una enzima que contiene un grupo prostético hemo (que contiene hierro) ya que es inhibida por la cianida. En 1937 Sumner y Dounce purificaron y cristalizaron la catalasa procedente de hígado de ternera (SCANDALIOS y cols., 1997).

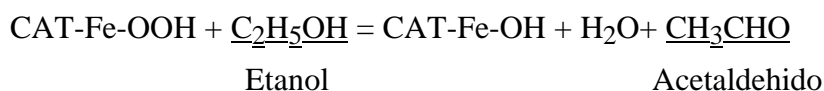
Catalasa ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oxidorreductasa, EC 1.11.1.6; CAT) es una enzima tetramérica con un grupo hemo en cada subunidad. Se encuentra en todos los organismos aeróbicos y todo indica que su función es degradar rápidamente peróxido de hidrógeno. La catalasa es uno de los más activos catalizadores producidos por la naturaleza. Es única entre las enzimas que degradan  $H_2O_2$  porque lo hace de una manera muy eficiente energéticamente por ello se ha propuesto como sistema regulador de la homeostasis de peróxido de hidrógeno en la célula.

Dependiendo de la concentración de peróxido, ejerce una función dual. A bajas concentraciones actúa **peroxidáticamente** de modo que una variedad de donores de hidrógeno, como el etanol, el metanol o el ácido ascórbico, pueden ser oxidados. A altas concentraciones de substrato, la catalasa descompone el peróxido de hidrógeno rápidamente sirviéndose de una reacción **catalítica** en la cual el  $H_2O_2$  actúa tanto como aceptor, como donador de moléculas de hidrógeno (BERKALOFF y cols., 1988).

Las pruebas espectrofotométricas y cinéticas sugieren que la catalasa utiliza un **mecanismo de dos pasos** en la reacción peroxidática y en la catalítica. En el primer paso el hierro del grupo hemo de la catalasa interacciona con el peróxido de hidrógeno para formar peróxido de hidrógeno rico en hierro.



Este peróxido de hierro intermediario (CAT-Fe-OOH) es denominado **Compuesto I**, puede ser detectado *in vitro* e *in vivo*, dado que altera las propiedades espectrofotométricas del hemo de la catalasa. De hecho, debido a las propiedades especiales de la cinética de la catalasa, el compuesto I es utilizado como un indicador de la concentración de peróxido *in vivo*. A bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el compuesto I puede ser reducido peroxidáticamente por donores de hidrógeno como el etanol.



No obstante, a altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el compuesto I reacciona con una segunda molécula de peróxido de hidrógeno para producir agua y  $\text{O}_2$  molecular, mediante la vía catalítica. En esta forma, tiene una "aparente constante de Michaelis" muy alta por lo que no es fácilmente saturable por el substrato (ASADA y TAKAHASHI, 1987). Así, la actividad de la enzima incrementa linealmente en un amplio rango de concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con lo cual se mantiene controlada la concentración intracelular de peróxido de hidrógeno. Parece ser, que en diferentes órganos de los mamíferos la catalasa funciona de esta manera. Por ejemplo, en órganos como el hígado y los riñones, donde hay altas concentraciones de catalasa, se encuentran también bajos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es más, si la actividad de la catalasa se inhibe, las concentraciones de peróxido aumentan en el hígado (YANG y DePIERRE, 1998). En órganos como el corazón con bajas concentraciones de catalasa aparecen altos niveles endógenos de peróxido (CHEN y cols., 1996). Sin embargo, no está clara la importancia de la catalasa en el metabolismo extraperoxisomal de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A este respecto, en estudios con hepatocitos aislados, se ha demostrado que ante situaciones donde se produce una disminución del glutatión (GSH) (Tripéptido implicado en los procesos de degradación del peróxido de hidrógeno a través de mecanismos de reducción-oxidación) la catalasa metaboliza el peróxido producido por el CYP450 (JONES y cols., 1978). Por lo tanto parece posible que en situaciones de extremo estrés oxidativo, que en la mayoría de los casos produce una disminución en los niveles de GSH, la catalasa se vuelve esencial en la citoprotección (CHEN y cols., 1996).

En el SNC, el oxígeno y las especies de oxígeno reactivas (ROS) son también producidas como consecuencia del metabolismo fisiológico. Algunas características bioquímicas y fisiológicas convierten al tejido nervioso en especialmente vulnerable al

ataque oxidativo. Estas características incluyen un alto nivel de actividad metabólica oxidativa, una alta concentración de moléculas susceptibles al ataque de las especies de oxígeno reactivas (por ejemplo los ácidos grasos polinsaturados) y un bajo nivel de "moléculas limpiadoras" (WILSON, 1997).

### **El Oxígeno y las Especies de Oxígeno Reactivas (ROS).**

Los organismos aeróbicos obtienen ventajas energéticas significativas utilizando oxígeno molecular ( $O_2$ ) como terminal oxidante en la respiración. Sin embargo, aunque el dioxígeno por si mismo, es relativamente no reactivo e inocuo tiene el potencial de ser reducido parcialmente para formar especies intermedias tóxicas. Tales especies son oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas moléculas son formadas durante las funciones celulares normales y también como consecuencia de diversos ataques ambientales a los que los organismos se encuentran expuestos. Tales ataques incluyen radiaciones, partículas contaminantes como los metales pesados, herbicidas, patógenos, etc (SCANDALIOS, 1997).

Cada una de las especies de oxígeno reactivas intermediarias puede reaccionar con una variedad de biomoléculas, alterando o bloqueando su actividad biológica. El efecto biológico combinado de estas especies de oxígeno tóxicas sobre los organismos es denominado "estrés oxidativo".

Para minimizar el efecto dañino del oxígeno activado, los organismos disponen de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que reducen el estrés oxidativo mediante la eliminación de las especies de oxígeno dañinas. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran generalmente pequeñas moléculas como: el tripéptido glutation, cisteína, hidroquinones, ascorbato, etc (WILSON, 1997).

Las defensas antioxidantes enzimáticas son enzimas capaces de eliminar o neutralizar ROS. Estas incluyen: Glutation reductasa (elimina  $H_2O_2$  en las mitocondrias), Catalasas y Peroxidasas (eliminan muy eficientemente  $H_2O_2$  en diversos compartimentos celulares) y Superóxido dismutasas (que elimina el anión superóxido en diferentes compartimentos celulares). De entre estas defensas, son la CAT y la SOD las más eficientes y críticas debido a su ubicuidad y a su acción combinada en

transformar el potencialmente dañino  $O_2\cdot$ - primero en  $H_2O_2$  (por la acción de SOD) y posteriormente en agua (por la acción de CAT).

Se hace claro pues, que es necesario y crítico para la supervivencia de la vida en un ambiente con oxígeno, la existencia de un sistema de defensa contra la toxicidad que ese oxígeno supone. Estas defensas se han desarrollado a lo largo de la evolución y prueba de ello son la gran variedad de citocromo oxidasas, de hidroperoxidasas (entre las que está la catalasa) y de superóxido dismutasas que se pueden encontrar en la actualidad en todos los organismos y que permiten la eliminación de las inevitables concentraciones de ROS generadas durante el normal desarrollo aeróbico. Sin embargo se necesita de un mayor conocimiento de los mecanismos utilizados por los organismos para movilizar sus defensas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo resultante de la actividad normal metabólica o procedente de ataques ambientales. Hay muchos casos que indican que incrementos en el estrés oxidativo llevan a incrementos correlativos en algunas respuestas antioxidantes. Sin embargo, hasta la fecha, poco se conoce en relación a los mecanismos por los cuales el genoma percibe el ataque oxidativo y moviliza señales de transducción o mecanismos genéticos reguladores (SCANDALIOS y cols., 1997).

### **Producción intracelular de peróxido de hidrógeno.**

A diferencia de los radicales de oxígeno, el peróxido de hidrógeno puede difundir rápidamente a través de las membranas biológicas; por ello, puede causar estrés oxidativo lejos del lugar donde se ha formado. Aunque el  $H_2O_2$  por sí mismo es un oxidante relativamente estable y no fácilmente reactivo, algunas biomoléculas son directamente sensibles a él si se encuentra en niveles fisiológicamente relevantes. Las metaloproteínas, entre ellas las que contienen el grupo hemo y las Cu/Zn superóxido dismutasas, son sensibles al peróxido de hidrógeno. El peróxido reacciona con estas proteínas causándoles la liberación del ion metal y haciendo así que pierdan su actividad biológica (WILSON, 1997).

El  $H_2O_2$  es producido en cantidades significativas en varios organelos subcelulares. Cada organelo tiene a la vez lugares diana para el estrés oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno, así como también mecanismos para su eliminación.

Uno de los organelos que está más relacionado con la producción de peróxido de oxígeno son los **peroxisomas**. Los peroxisomas son organelos citoplasmáticos que



contienen la mayor parte de la catalasa y del peróxido de hidrógeno producido por las oxidasas y que por lo tanto están implicados principalmente en el metabolismo del oxígeno (BERKALOFF y cols., 1988). En ellos el  $H_2O_2$  es producido por las oxidasas, implicadas en la oxidación catabólica de una variedad de biomoléculas. El contenido en enzimas de los peroxisomas varía significativamente con las necesidades metabólicas del tipo específico de célula y el estado de desarrollo de la misma. Además de todas las enzimas generadoras de  $H_2O_2$ , todos los peroxisomas contienen la enzima prototípica en el consumo de peróxido de hidrógeno: la catalasa. Estudios recientes (MORENO y cols., 1997) han conseguido demostrar que en cerebro de rata, una de las formas de las SODs, la CuZnSOD, se expresa únicamente en las neuronas y en concreto, dentro de ellas, predomina en el citosol pero también en los peroxisomas sugiriendo que estas células requieren de un mecanismo protector específico contra el anión superóxido. En este estudio también se pone de manifiesto la coincidencia de ambas enzimas (SOD y Catalasa) en los mismos grupos de neuronas y dentro de ellas en los mismos organelos, lo que hace pensar en un eficaz sistema enzimático de eliminación de aniones superóxido a través de la CuZnSOD, pero también en un sistema de eliminación de peróxido de hidrógeno mediatizado por la catalasa.

En las **mitocondrias** la producción de  $H_2O_2$  se asocia con la respiración. La ratio de peróxido generado depende directamente del estado metabólico de la mitocondria. A mayor flujo de electrones a través de la cadena de electrones, mayor es la producción de peróxido de hidrógeno.  $O_2^-$  es el precursor de  $H_2O_2$  en la mitocondria. El anión superóxido no atraviesa la membrana de la mitocondria dado que debido a su carga no resulta permeable, aunque lo contrario ocurre con el peróxido de hidrógeno. Por ello, una isoenzima mitocondrial de la SOD degrada  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$  (SCANDALIOS, 1995). En los mamíferos parte del peróxido de hidrógeno generado puede ser parcialmente metabolizado por la glutathion peroxidasa. Otra parte del peróxido de hidrógeno formado en la mitocondria difunde hacia el exterior de ella y es degradado por otros sistemas como la catalasa, aunque en algunos tejidos como el corazón existe catalasa en el interior de las mitocondrias (BERKALOFF y cols., 1988).

Poco se conoce sobre la cantidad de peróxido de hidrógeno formado *in vivo* en el **citosol**, el **retículo endoplásmico** y el **núcleo** o de los procesos metabólicos que lo generan. Generalmente se acepta que la catalasa también se encuentra en el citosol y que puede eliminar el peróxido de hidrógeno citosólico. Adicionalmente, el peróxido de hidrógeno generado en los mencionados organelos puede difundir al interior de otros,

como los peroxisomas, con una capacidad excedente para degradar  $H_2O_2$  (SCANDALIOS, 1995).

## **1.6. El papel de la catalasa en el mecanismo de acción del etanol en el SNC.**

Como se ha visto anteriormente, aunque numerosos estudios confirman la presencia de los principales sistemas enzimáticos implicados en la oxidación del etanol en el cerebro, queda pendiente la confirmación de que realmente se produce dicho metabolismo, de cual es la vía enzimática predominante y finalmente, del posible significado funcional de la oxidación del etanol en el sistema nervioso central.

### **Metabolismo central del etanol a través de la catalasa.**

Las primeras pruebas indirectas de la oxidación de etanol en acetaldehído llevada a cabo por la catalasa en el cerebro fueron presentadas por Cohen y cols. (1980; 1983). Estos autores demostraron en un estudio *in vivo* que el 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT) se une al compuesto I y lo inactiva de manera definitiva. Sin embargo, la administración previa de etanol previene de la inhibición que el AT ejerce sobre el compuesto catalasa-peróxido de hidrógeno, indicando con ello, de manera indirecta, que *in vivo* el etanol se une a la catalasa. El aminotriazole es un inhibidor dependiente de peróxido de hidrógeno, es decir, más que un inhibidor de la catalasa lo es del compuesto I. De hecho, la ausencia de peróxido de hidrógeno hace que esta interacción se de en menor medida y requiera de dosis muy elevadas de AT (HEIM y cols., 1955; 1956). La reacción entre compuesto I y AT provoca la pérdida de la actividad catalítica y la destrucción de la proteína por lo que se requiere de nueva síntesis de esta enzima para recuperar dicha actividad. De este modo, cuando la administración de AT es anterior a la de etanol, el AT se comporta como un antagonista no competitivo (De MASTER y cols., 1988; ARAGON y cols., 1991d). Por otra parte, dado que el etanol parece ser un sustrato con gran afinidad por el compuesto I, su administración previa (respecto al aminotriazole) posee un efecto protector respecto a la acción de éste (COHEN y cols., 1980; 1983), al igual que ocurre con la administración previa de etanol y el bloqueo del efecto inhibidor de la cianamida y del 4-hidroxipirazole sobre la catalasa (ARAGON y cols., 1991d). Otros estudios que administran AT y cianamida *in vivo* han registrado la producción de acetaldehído en homogenados cerebrales a los que se administra etanol y

han comprobado que ambos inhibidores bloquean de manera dosis dependiente la producción de acetaldehído (ARAGON y cols., 1992b). Así mismo, otros estudios demuestran que la actividad de la catalasa así como la producción de acetaldehído en homogenados cerebrales de ratas recién nacidas y adultas resulta correlacionar entre ambos grupos de edad (GILL y cols., 1992).

A su vez, en estudios *in vitro*, se ha podido constatar que la presencia en la incubación de homogenados cerebrales de AT, cianamida o azida sódica (todos ellos inhibidores de la catalasa) causan un decremento en la formación de acetaldehído dependiente de la dosis (ARAGON y cols., 1992b; GILL y cols., 1992). En estos mismos estudios se descarta el papel de la ADH y del CYP450 como responsables de la oxidación del etanol en el cerebro (ARAGON y cols., 1992b; GILL y cols., 1992) utilizando metirapona, como inhibidor de CYP450, y pirazol, como inhibidor de ADH. Ambos inhibidores demostraron no ejercer ninguna influencia en la formación de acetaldehído a partir de etanol en homogenados de cerebro de rata. Junto a esto la adición exógena de peróxido de hidrógeno o de sistemas de generación de éste (como la glucosa oxidasa), produjo un incremento en la generación de acetaldehído (ARAGON y cols., 1992b; GILL y cols., 1992).

Otro tipo de pruebas vienen de la utilización de subestirpes de ratones genéticamente diferentes en los niveles de catalasa: ratones normales (C3HN) y acatalasémicos (C3HA) (ARAGON y AMIT, 1993). Estos animales parecen ser idénticos en todas sus características excepto en los niveles de la enzima catalasa, que son alrededor de un 50% más bajos en el grupo C3HA. Esta diferencia fue provocada por irradiación de rayos-X en la estirpe C3H (FEINSTEIN y cols., 1966). Cuando los homogenados de cerebro procedentes de ratones normales (C3HN) y acatalasémicos (C3HA) fueron incubados con etanol, aparecieron diferencias significativas en la cantidad de acetaldehído generado en cada uno de los grupos (ARAGON y AMIT, 1993), siendo los ratones acatalasémicos los que menor producción de acetaldehído produjeron.

Un estudio más reciente al respecto, destaca la acumulación diferencial de acetaldehído en distintas estructuras del cerebro de ratas tras ser incubadas con diferentes concentraciones de etanol (ZIMATKIN y cols., 1998). Esta acumulación resulta más prominente en aquellas estructuras cerebrales donde se encuentra más cantidad de catalasa (ZIMATKIN y LINDROS, 1996). También se demuestra que la acumulación de acetaldehído es parcialmente eliminada por la previa administración de AT (ZIMATKIN y cols., 1998). En una línea similar hay que ubicar los datos que

muestran la capacidad del aminotriazole para reducir, de forma dependiente de dosis, la formación de acetaldehído en cultivos de neuronas hipotalámicas, así como la liberación de  $\beta$ -endorfinas mediada por éste (REDDY y cols., 1995).

Un dato interesante que se deriva de los trabajos anteriores es que las concentraciones de etanol empleadas en los estudios *in vitro* (0-100 mM) en cerebros de rata (ARAGON y cols., 1991d; 1992b; GILL y cols., 1992; ZIMATKIN y cols., 1998), están en el mismo rango que los niveles de etanol detectados en cerebros de ratas tras una ingesta suficiente como para producir efectos farmacológicos (GILL y cols., 1986). Los niveles de acetaldehído detectados en el cerebro de ratas sin adición de peróxido de hidrógeno se encuentran en valores entre 2.4 y 11.9 nM/h/mg de proteína (ARAGON y cols., 1992b; GILL y cols., 1992; ZIMATKIN y cols., 1998), valores que han demostrado ser biológicamente significativos (ZIMATKIN, 1991; GILL y cols., 1992).

Junto a esto, los estudios *in vivo* también confirman que los niveles endógenos de peróxido de hidrógeno no son factores limitantes para la oxidación del etanol por la catalasa en el cerebro. Como ya hemos mencionado, la catalasa requiere como cosustrato al peróxido de hidrógeno para oxidar el etanol. Pero, el hecho de que en los homogenados de cerebro se realice tal oxidación indica que *in vivo* hay  $H_2O_2$  presente y que resulta suficiente para formar el compuesto I (GILL y cols., 1992; ZIMATKIN y cols., 1998). Cuales son las fuentes de dicho peróxido es una cuestión pendiente, pero se plantean diversas posibilidades, entre ellas:

-El metabolismo del anión superóxido por la SOD, produce  $H_2O_2$ . El cerebro tiene abundancia de SOD (MORENO y cols., 1997) y el superóxido puede proceder de muchas fuentes, entre ellas la oxidación de la hemoglobina o las catecolaminas, o el sistema de CYP450, por ejemplo (CROSS y JONES, 1991).

-El ácido ascórbico, que se encuentra en gran concentración en el cerebro, es capaz de incrementar la producción de peróxido de hidrógeno (PRAT y TURRENS, 1990).

-También diversas enzimas producen  $H_2O_2$  como subproducto de sus reacciones, como por ejemplo: la óxido nítrico sintetasa (HEINZEL y cols., 1992).

### **Catalasa y conducta inducida por etanol.**

A partir de la consideración de la catalasa como una vía factible de producción de acetaldehído en el sistema nervioso, ha existido un notable empeño por parte de algunos grupos de investigadores en hallar diferentes **herramientas farmacológicas** capaces de modificar la actuación de la catalasa. También, se ha procurado la obtención de sujetos (ratones o humanos) con **diferencias genéticas** en este mismo sustrato y no faltan autores que destacan la necesidad de la obtención de animales "*knockout*" para la catalasa como modelos ideales en el estudio de las relaciones entre niveles de catalasa y conducta inducida por etanol (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997).

Ambos tipos de recursos han permitido probar esta "hipótesis de la catalasa" en un gran número de paradigmas experimentales (conductuales) así como en distintos ensayos bioquímicos (para una reciente revisión SMITH y cols., 1997). Las correlaciones establecidas entre ambos tipos de pruebas (conductuales y bioquímicas) suponen, sin duda, un adecuado principio para dar una explicación psicobiológica a la pregunta con que iniciamos este trabajo.

Las **estrategias genéticas** son muy usadas en el estudio de la neurobiología de diferentes conductas (CRABBE y BELKNAP, 1992). Estas tratan de obtener poblaciones de sujetos experimentales semejantes en todas las características excepto en alguna que supone el objeto de estudio. Este elemento diferencial puede ser un comportamiento o un sustrato, generalmente neural, y es aislado mediante una reproducción selectiva de los individuos o por intervenciones directas en el genoma.

Cuando se usa como criterio de selección una variable conductual existe el gran inconveniente de que, aunque se logren grupos de animales realmente diferentes en alguna peculiaridad conductual, poco se conoce acerca del mecanismo por el cual se da esa divergencia. Con todo, este tipo de procedimientos siguen siendo muy usados y así, en el estudio de la neurobiología del alcohol, podemos encontrar un variado número de estirpes seleccionadas por criterios conductuales (PHILLIPS y cols., 1989). En este sentido y respecto a la "hipótesis de la catalasa", recientemente se ha constatado que una de las estirpes de ratas con mayor consumo de etanol (P, preferentes) poseen niveles mayores de catalasa que las NP (no preferentes), lo que parece abogar por una implicación de esta enzima y del acetaldehído en el consumo voluntario de etanol (GILL y cols., 1996)

Otra posibilidad es provocar (o aprovechar) diferencias genéticas en algún sustrato que resulta de interés y evaluar cómo éstas se traducen en diferencias conductuales en diversos paradigmas experimentales. De este modo, los resultados obtenidos informan de la implicación o no del elemento evaluado. Dentro de este tipo de estrategias pueden situarse los trabajos realizados con las estirpes de ratones C3HN y C3HA.

Asumiendo esta "hipótesis de la la catalasa" y suponiendo una implicación activa del acetaldehído en gran parte de las conductas inducidas por etanol, se han realizado una serie de trabajos que evalúan las diferencias de ambas subestirpes en varios paradigmas conductuales (ARAGON y cols., 1992a; ARAGON y AMIT, 1993). Así, se ha comprobado que la actividad locomotora inducida por etanol a diferentes dosis es menor en los ratones C3H-A que en los ratones C3H-N. Este efecto no se debe a ninguna anomalía general ya que no se constatan diferencias tras un tratamiento control (solución salina), y es específico para el alcohol, puesto que ambas estirpes presentan idéntica inducción de actividad locomotora tras recibir diferentes dosis de cocaína. Tampoco este resultado es atribuible a un efecto periférico dado que en los niveles séricos de alcohol y acetaldehído no se encontraron diferencias.

Por otra parte, cuando estos animales son evaluados en el paradigma de narcosis, se observa que los ratones C3H-A presentan una mayor latencia en la recuperación del reflejo de enderezamiento (*righting reflex*) que los C3H-N. Este hecho está en consonancia con las asunciones generales realizadas acerca de los efectos que podrían estar mediados por el acetaldehído y aquellos que no, ya que parece indicar que el mecanismo de inducción de la narcosis está más relacionado con el etanol que con el acetaldehído.

También el consumo voluntario de etanol en ambos grupos de ratones ha sido evaluado. Los resultados obtenidos señalan una ausencia de diferencias significativas entre ambas estirpes a concentraciones bajas y moderadas (menores del 12%) y un mayor consumo de los C3H-A a concentraciones más elevadas (entre un 13 y un 18%). Además, el comportamiento de los ratones C3H-A muestra una preferencia idéntica independientemente de la concentración (lo que se traduce en un incremento inespecífico del consumo de alcohol conforme aumenta la concentración). Dado que este valor se mantiene en torno a un 50%, los resultados obtenidos parecen mostrar que estos animales no encuentran ninguna diferencia entre ambos fluidos y los consumen equitativamente hasta que (en concentraciones superiores al 20%) la posible aparición

de efectos periféricos tóxicos parecen inducir un descenso en la preferencia y consecuentemente, en el alcohol (g/kg) consumido.

De este modo, la incapacidad de los ratones de C3HA de consumir este metabolismo del etanol en niveles similares a los conseguidos por los C3HN, comprobada por estos mismos autores (ARAGON y cols., 1992a; ARAGON y AMIT, 1993), impide el establecimiento de un patrón normal de ingesta en los ratones acatalasémicos.

Conclusiones análogas pueden extraerse tras evaluar la relación entre consumo de alcohol y niveles de catalasa encefálica en otras dos estirpes de ratones (C57BL/6 y DBA/2). Los primeros, presentan una mayor preferencia por el etanol al tiempo que unos niveles menores de catalasa, mientras que los DBA/2 presentan un panorama simétrico en ambas variables (ARAGON y AMIT, 1987). Estos datos nuevamente sugieren que la catalasa encefálica es fundamental para proveer un determinado nivel de acetaldehído que medie los efectos reforzantes que aseguren el consumo de etanol a concentraciones bajas o moderadas.

Finalmente señalar que, estas diferencias genéticas halladas en estirpes de origen genético controlado (consanguíneas) han podido ser extrapoladas a las diferencias observables en una población heterogénea a partir del establecimiento de correlaciones entre niveles de consumo de etanol y los de catalasa cerebral (ARAGON y AMIT, 1987). Estos trabajos muestran una relación directamente proporcional entre ambos factores. Este dato, junto con la evidencia obtenida en este mismo experimento de que el consumo de etanol no induce una mayor actividad de la catalasa, parece indicar que un mayor nivel de la enzima es un factor predictor de un mayor consumo de alcohol y no a la inversa (ARAGON y cols., 1985b). Apoyando este último argumento, se constata que el nivel de actividad peroxidática de la catalasa sanguínea medida en animales que no han tenido contacto con el etanol correlaciona significativamente con los niveles de alcohol consumidos con posterioridad (AMIT y ARAGON, 1988).

Estas aportaciones realizadas desde la manipulación de características genéticas, han sido completadas con diferentes estudios en los cuales la catalasa se ha manipulado mediante **procedimientos farmacológicos**. La única herramienta utilizada en los estudios bioconductuales de la relación entre catalasa y conducta inducida por etanol, ha sido el inhibidor no competitivo de la catalasa 3-amino-1,2,4-triazole (AT).

Hemos expuesto con antelación, numerosos estudios bioquímicos que prueban esta interacción entre el AT y la catalasa en tejido cerebral, así como sus consecuencias sobre la producción de acetaldehído (ARAGON y cols., 1991b,c; 1992a,b; GILL y cols., 1992; ZIMATKIN y cols., 1998). A nivel conductual, ha existido también un notable interés por demostrar esta relación entre el binomio catalasa-acetaldehído y AT en la conducta inducida por etanol. Así, se ha podido constatar mediante un sistemático estudio de dosis y tiempos cómo este compuesto es capaz de interferir la actividad locomotora inducida por el etanol en ratones (ESCARABAJAL y cols., 1999). Este estudio replica de forma sólida descripciones previas (ARAGON y cols., 1989) que presentaban este efecto aunque en un rango mucho más restringido de dosis o intervalos temporales.

Lo descrito para el aminotriazole no sólo es comparable a las diferencias observadas entre ratones normales y acatalasémicos, sino que se reproduce en éstos; así, en los C3HN la administración de AT reduce la actividad locomotora inducida por el alcohol a los niveles que éste genera en los C3HA sin ningún tratamiento previo. De forma paralela, la administración de un pretratamiento idéntico con aminotriazole también reduce la actividad en el campo abierto observada tras diferentes dosis de etanol en los C3HA (ARAGON y AMIT, 1993).

El paradigma de narcosis también ha sido utilizado en la evaluación de los efectos del AT en interacción con etanol. En este sentido, se ha comprobado que, en ratas, diferentes autores (TAMPIER y cols., 1988; ARAGON y cols., 1991c) muestran que el aminotriazole reduce el tiempo de narcosis y evidencian que en este comportamiento, como en otros muchos (CUNNIGHAN y cols., 1993), existen importantes diferencias entre las especies de roedores ya que son resultados opuestos a los obtenidos en ratones (ARAGON y AMIT, 1993).

También la liberación de corticoesterona producida por una administración aguda de etanol parece mostrar una reducción si previamente el animal ha recibido un pretratamiento con aminotriazole. Este efecto se ha comprobado en ratas (ARAGON y cols., 1987) y es, además, coincidente con resultados obtenidos para las estirpes de ratones C57BL/6 y DBA/2, lo que parece sugerir una relación entre niveles de catalasa y magnitud de la respuesta de la corticoesterona (ARAGON y AMIT, 1986).

Por otra parte, la respuesta de hipotermia (o poiquiloterminia) inducida por etanol parece verse afectada por el 3-amino-1,2,4-triazole. En este caso, la inhibición de la



catalasa se traduce en una mayor reducción de la temperatura en los animales no tratados con AT (ARAGON y cols., 1991c).

El CAS (condicionamiento aversivo de sabor) puede ser inducido por etanol (ARAGON y cols., 1986; 1991a). El uso de aminotriazole bloquea este condicionamiento aversivo, observando además que el efecto es específico en tanto que carece de consecuencias sobre el CAS inducido por otras sustancias como el litio (ARAGON y cols., 1985a).

El consumo de etanol en una situación de libre elección es, sin duda, un paradigma de enorme relevancia en el intento de explicar el uso de bebidas alcohólicas en humanos. Sin duda también lo es para la problemática acerca de cuál es el agente que media los efectos reforzantes de las mismas. Así, no es de extrañar que haya sido uno de los procedimientos conductuales más usados para evaluar la "hipótesis de la catalasa". En este sentido, el aminotriazole, administrado intraperitonealmente, ha demostrado su capacidad de inhibir la ingesta de una solución de etanol (10% v/v) en una situación de libre elección respecto a agua. Este efecto parece ser dosis dependiente para el AT y reversible en el tiempo (ARAGON y AMIT, 1992; ROTZINGER y cols., 1994). Estos datos han sido reproducidos con posterioridad en diferentes estirpes de ratones por otros autores (KOECHLING y AMIT 1994) y también en ratas seleccionadas por sus diferencias en el consumo de etanol (UCh) (TAMPIER y cols., 1995). Este efecto muestra ser específico en la mayoría de trabajos, en tanto que sólo parece reducirse el consumo de etanol y no el de otras drogas (ARAGON y AMIT, 1992; KOECHLING y AMIT, 1994).

Así, tomando estos datos en su conjunto, se puede afirmar que la implicación del binomio catalasa-acetaldehído en el mecanismo de acción de gran parte de los efectos y conductas habitualmente vinculadas al etanol posee un importante respaldo en la actualidad. Con todo, una revisión reciente (HUNT, 1996) sin llegar a cuestionar estas pruebas, presenta algunas debilidades que podría padecer esta hipótesis. De las críticas planteadas, posiblemente la más sólida sea aquella que atañe al uso generalizado del aminotriazole como, prácticamente, única herramienta farmacológica en la evaluación de esta teoría.

### **Otras herramientas farmacológicas: El plomo.**

Los datos presentados como la evidencia farmacológica a favor de la hipótesis de la catalasa se basan fundamentalmente en experiencias que implican la manipulación de esta enzima a través del AT. Este efecto, aunque de sobra contrastado, no es, con toda seguridad, el único de esta sustancia. De hecho, desde hace mucho tiempo, se conoce que el AT actúa en la esterificación del metabolismo de los lípidos del hígado, disminuyendo el nivel de éstos (ISHII y cols., 1977) y aunque dicha reducción parece independiente del nivel de inhibición sobre la catalasa, no permite descartar que este (u otros efectos del aminotriazole) puedan tener alguna consecuencia sobre la conducta inducida por etanol.

Como hemos visto, aunque a nivel bioquímico el rango de productos utilizados es mayor (MACDONALD y PISPA, 1980; ROTZINGER y cols., 1995; GILL y cols., 1992; DEMASTER y cols., 1986), a nivel bioconductual hasta la fecha no han existido alternativas al AT. En este sentido en nuestro laboratorio se están realizando estudios bioconductuales con resultados totalmente en la línea de la hipótesis de la catalasa. En estos estudios se han utilizado dos demostrados inhibidores de la actividad de la catalasa: la cianamida y la azida sódica (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999a,b) y han obtenido correlaciones positivas y significativas entre actividad de la catalasa encefálica y actividad locomotora inducida por etanol.

Así, la evidencia que aportan las herramientas farmacológicas capaces de inhibir el nivel de catalasa ayudan a consolidar los resultados ya obtenidos con otro inhibidor como el aminotriazole. En cualquier caso, los estudios que sustentan el papel de la catalasa en las conductas inducidas por etanol se han limitado al uso de inhibidores competitivos o no competitivos pero en ninguno de ellos se comprueba el efecto de la **potenciación de la actividad de la catalasa**. Es precisamente este hecho el que da origen y sentido al presente trabajo. En la posterior serie de experimentos hemos considerado la utilización del acetato de plomo principalmente como potenciador de la actividad de la catalasa y, por tanto, como un "agonista" de las acciones conductuales del etanol. Trataremos de demostrar que no sólo hay una relación entre conducta inducida por etanol y actividad de la catalasa cuando esta es inhibida sino también cuando aumentamos los niveles de actividad de la enzima.

Queremos destacar también acerca del acetato de plomo como herramienta farmacológica, que resulta especialmente útil dado que, modificaciones en la vía y en

los periodos de administración de esta sustancia producen efectos opuestos en los niveles de actividad de la catalasa.

De este modo esperamos delimitar las condiciones óptimas para el uso del acetato de plomo en la evaluación de la hipótesis de la catalasa, así como ampliar las pruebas con que cuenta esta opción teórica completando, junto con otros autores (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999a,b). Creemos que de este modo contribuiremos además a responder la cuestión con la que iniciamos este trabajo, en tanto que ahondaremos en la posibilidad de que el acetaldehído esté a la base del mecanismo de acción de los procesos psicofarmacológicos y conductuales inducidos por etanol.

## ***CAPITULO 2.***

### ***FARMACOLOGIA DEL PLOMO.***

El plomo es un metal pesado virtualmente ubicuo en el ambiente como resultado de su ocurrencia natural y principalmente por su uso industrial. Esta última aplicación, ha ocasionado la aparición de un problema medioambiental ya que no sólo contamina, sino que se degrada difícilmente y se acumula en los organismos vivos. En los últimos 20 años, ha habido un considerable progreso en el conocimiento de la potencial toxicidad que supone la exposición al plomo y se han producido avances tanto en las estrategias de intervención como en la prevención (BRESSEL y GOLDSTEIN, 1991).

Con ello se han logrado mitigar e incluso eliminar algunos de los síndromes etiológicamente vinculados al plomo: El Síndrome del Saturnismo, el de Encefalopatía Plúmbica y el amplio cuadro catalogado como "Hiperactividad inducida por plomo".

Pasemos ahora a describir brevemente algunos de los aspectos relacionados con la toma de contacto que llevan a la intoxicación por plomo en humanos.

#### **2.1. Farmacocinética.**

Sus vías de penetración más comunes son tres (CALDERON, 1993):

-Respiratoria, inhalando vapores que contienen plomo. Se trata de la vía más común en el caso de exposición laboral a plomo. Tiene lugar a partir de partículas muy pequeñas de óxido de plomo, formadas al condensarse en el aire los vapores de plomo que se forman cuando éste llega a los 500°C de temperatura y se vaporiza. Del plomo absorbido por vía pulmonar una cantidad comprendida entre el 40 y el 60% se encuentra en la sangre, el resto va a otros compartimentos como hueso y linfa.

-Cutánea. Esta vía raramente produce intoxicaciones graves, sólo en el caso de que el plomo entre en contacto con heridas profundas podría tener importancia. Los

compuestos orgánicos de plomo tienen más fácil su penetración en el organismo por la vía cutánea que los inorgánicos.

-Oral, a través de la ingesta de alimentos, agua o polvo contaminados. Esta es la vía más importante cuando la intoxicación se da en sujetos no expuestos laboralmente. Los alimentos aportan a nuestro organismo una cantidad de plomo que oscila entre los 100 y 200  $\mu\text{g}$  por día. La absorción intestinal de plomo es mayor en los niños o jóvenes que en los adultos, varía con el tipo de dieta y con el tipo de compuesto de plomo.

### **Distribución del plomo en el organismo.**

El plomo que penetra en el organismo por vía respiratoria o digestiva, pasa fácilmente a la sangre donde se incorpora a los glóbulos rojos. Es el plomo que se encuentra en los hematíes el que más contribuye al cuadro tóxico (BRESSEL y GOLDSTEIN, 1991).

En cuanto al transporte de plomo y su acúmulo, tradicionalmente se ha establecido un modelo de distribución en tres compartimentos (RABINOWITZ y col., 1973):

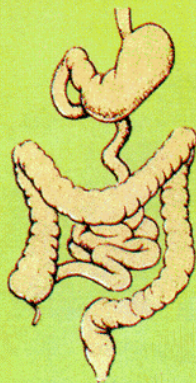
El primer compartimento lo forman la sangre y todos aquellos tejidos capaces de llegar a un equilibrio con ella. El plomo de este compartimento pasa al segundo, después al tercero y por último se elimina por la orina.

El segundo compartimento, lo constituyen los tejidos blandos y las partes activas del esqueleto. De este segundo tipo de tejidos, parte del plomo irá a estructuras como cabellos, uñas y secreciones intestinales.

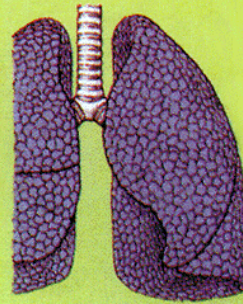
El tercer y más importante en cantidad lo constituye el esqueleto. El acúmulo en hueso aumenta con la edad, pudiendo llegar a 50 ppm. También se da una mayor acumulación en hueso, hasta un 30 % más, en los hombres que en las mujeres.

La vía más importante de eliminación es la renal (80%) aunque la intestinal también tiene cierto peso.

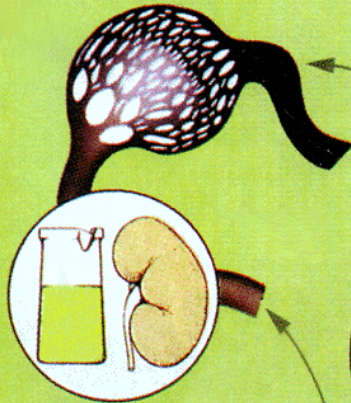
**DISTRIBUCION DEL PLOMO EN EL ORGANISMO HUMANO**



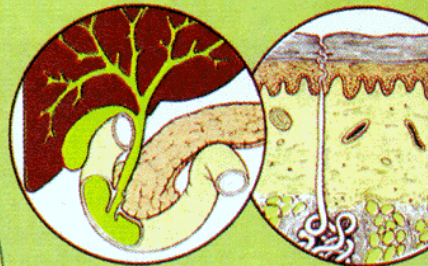
El 10 % aproximadamente del plomo ingerido en la dieta normal de un adulto se absorbe en el intestino. Existe también una cantidad importante de plomo que se absorbe por los pulmones.



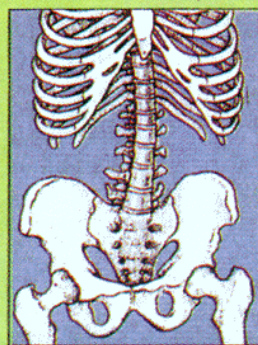
A continuación, el plomo se distribuye en tres depósitos corporales bien definidos:



1) El depósito «sanguíneo» elimina plomo por la orina; el plomo de este depósito tiene una vida media de 38 días. Este depósito está en equilibrio dinámico con los otros dos depósitos.



2) El depósito de los «tejidos blandos» elimina plomo por la bilis, sudor y tegumentos. El plomo de este depósito también tiene una vida media de 38 días aproximadamente.



3) El depósito «óseo» contiene una cantidad de plomo 100 veces mayor que la que poseen los otros dos depósitos. Debido a que el metabolismo óseo del plomo sólo se realiza de forma completa una vez cada 30 años, es muy importante prevenir la acumulación de plomo en este sistema.

Por tanto, una vez ha penetrado en el organismo, el plomo pasa a la sangre, se deposita en los tejidos blandos (como el SN), en la médula ósea, tejido óseo, hígado, riñón o se elimina por orina y heces (CALDERON, 1993).

## 2.2. Mecanismos de acción.

En el nivel biológico se ha demostrado que el plomo produce citotoxicidad induciendo la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y dando lugar a la formación de radicales libres (FENITECAVA y cols., 1987; SRIVASTA y cols., 1990; GOYER, 1993). La peroxidación de los lípidos de membrana ha sido identificada como una reacción implicada en los mecanismos celulares de envejecimiento, en los efectos deletéreos causados por la exposición a contaminantes ambientales y en una gran variedad de condiciones patológicas (SLATER, 1984). *In vivo*, la peroxidación lipídica es un proceso en el cual algunas formas activadas de oxígeno reaccionan con ácidos grasos polinsaturados y ceden (producen) peróxido semiestable vía un mecanismo de **radicales libres** (VALENZUELA y cols., 1989).

Los peróxidos de origen lipídico que resultan tóxicos para la célula si se acumulan en ella, son metabolizados en condiciones normales por las enzimas citosólicas de defensa. Enzimas antioxidantes como la catalasa, las glutatión transferasa, reductasa y peroxidasa (GST, GR y GPx respectivamente) así como la superóxido dismutasa (SOD) eliminan los radicales libres y el peróxido, detoxificando por tanto la célula. Es más, generalmente, se ha sugerido que la lípido peroxidación se inicia como consecuencia de alteraciones tales como una disminución generalizada en el sistema antioxidante celular (SOMASHEKARAI AH y col., 1992).

El plomo ha demostrado, directa o indirectamente, incrementar la actividad de la catalasa en diferentes estudios bioquímicos. En estos estudios encontramos, por ejemplo, que el plomo induce catalasa en el cerebro y cerebelo de ratas recién nacidas entre los días 6 al 16 después de su administración (VALENZUELA y cols., 1989). Estos resultados pueden estar relacionados con una potenciación de los procesos detoxificadores celulares en ambas regiones. Otros autores han mostrado que la administración de plomo incrementa la actividad de la catalasa cerebral a las 72 horas tras la administración del metal (SOMASHEKARAI AH y cols., 1992).

También ha sido demostrada la proliferación de peroxisomas en el SNC de embriones de pollo a los 16 días de una intoxicación aguda con nitrato de plomo (De

GENARO, 1987). Estos hallazgos han sido explicados como un aumento en los procesos detoxificadores de las células y juntos sugieren que la exposición aguda a diversos compuestos de plomo resulta en un aumento de la actividad de la catalasa encefálica.

Se desconoce cual es la acción directa del plomo en este proceso, aunque más bien se podría hablar de un cúmulo de acciones con resultados diferentes y hasta opuestos en función de las dosis, la duración de la exposición, el tipo de estudio (*in vivo* o *in vitro*) y de tejido estudiado.

Algunos de estos resultados serían por ejemplo la inhibición de ciertos pasos metabólicos que llevan a la **síntesis del grupo hemo**, grupo que forma parte de muchos de las enzimas antioxidantes (FONIA y cols., 1995). Se ha demostrado que, aunque el plomo por sí mismo no puede iniciar la peroxidación por la acción directa sobre los lípidos de la membrana, sí que estimula la destrucción del grupo hemo y con ello la síntesis de muchas enzimas que lo precisan. El plomo inhibe dos de las enzimas mitocondriales precursoras de la biosíntesis del grupo hemo: La coproporfirina oxidasa (ROSSI y cols., 1993). Esta inhibición enzimática llevaría finalmente a la lipidoperoxidación.

Las enzimas tradicionalmente afectadas por esta acción deletérea del plomo son la catalasa, la peroxidasa del glutatión (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD) de los eritrocitos. Su actividad antioxidante se ve disminuida por la acción del plomo y esto provocará un aumento en la concentración de lipidoperoxidación en las membranas de los eritrocitos (SUGAWARA y cols., 1991; SOMASHEKARAI AH y cols., 1992; HERMES y cols., 1991).

Por otro lado el plomo también parece estar implicado en la alteración de los niveles de glutatión (tripéptido antioxidante endógeno), produce un decremento del glutatión (GSH) hepático o sanguíneo (TANDOM y cols., 1997), o de las enzimas que lo reducen u oxidan con lo que se alteraría la formación de radicales libres y de los niveles de actividad y/o síntesis de las enzimas que los eliminan, entre ellos la catalasa (VALENZUELA y cols., 1989; TANDOM y FLORA, 1989).

Otro mecanismo por el cual el plomo ejerce sus efectos sobre el organismo está relacionado con el **ion calcio**. La concentración de iones libres  $Pb^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  posibilita los efectos tóxicos del plomo en las células. Las interacciones entre estos dos iones libres se da en varios niveles: En primer lugar, ambos compiten en la membrana



plasmática por los sistemas de transporte que permiten su entrada o salida, tales como los canales de calcio o la bomba de calcio. En segundo lugar, el plomo desequilibra la homeostasis intracelular de iones de calcio (SIMONS, 1993).

La capacidad del plomo para sustituir al calcio en algunos procesos reguladores del interior de las células ha sido ampliamente estudiado (GOLDSTEIN, 1993; SIMONS, 1993). En general el plomo interactúa con un gran número de mecanismos que dependen del calcio, tales como: la calmodulina (proteína que actúa como receptora de los iones  $Ca^{2+}$  y que se asocia a varias enzimas como la fosfodiesterasa o las proteinkininas), la proteinkinasa C, los canales de Potasio dependientes de iones  $Ca^{2+}$  y la liberación de neurotransmisores. De entre estas vías de actuación del plomo sobre el calcio la de mayor interés biológico es la activación de la PKC (proteína kinasa C) (GOLDSTEIN, 1993), dado que está implicada el metabolismo de los segundos mensajeros. Este sería uno de los posibles emplazamientos donde se ejercerían las alteraciones del plomo en el sistema nervioso.

Se ha demostrado, igualmente, que la exposición crónica al plomo, afecta a diversos **sistemas de neurotransmisión** (BOOZE y MACTUTUS, 1990).

-Dopamina (DA). Las Catecolaminas, especialmente la Dopamina (DA). Algunos estudios han sugerido que el tratamiento con plomo produce una pequeña pero significativa alteración de los niveles basales de DA cerebral, aunque otros autores no corroboran este dato (FLORA y TANDOM, 1987). Un estudio con ratas, donde se utilizó la intubación gástrica para inducir niveles de plomo en el cerebro, observó un decremento de los niveles de DA del 25% en el estriado, que persistieron aún después de que los niveles de plomo en el cerebro disminuyeran a la mitad (JASON y KELLOGG, 1980). Sin embargo, otros autores demuestran que la administración crónica de plomo produce un incremento de la biodisponibilidad de DA en el núcleo accumbens como un mecanismo compensatorio (POKORA y cols., 1996).

-Por lo que se refiere a la Norepinefrina (NE), algunos autores (SATIJA y cols., 1978) han encontrado un incremento generalizado de los niveles cerebrales de este neurotransmisor. Sin embargo en otros estudios donde el plomo se administra crónicamente se detectan concentraciones más bajas de las basales en estructuras troncoencefálicas (HRDINA y cols., 1976).

-Acetilcolina (ACh). Estudios, en los que se han utilizado como sujetos experimentales monos recién nacidos mantenidos en un tratamiento con dosis

moderadas de plomo durante periodos largos, indican que el deterioro conductual en campo abierto observado en estos animales, correlaciona con un deterioro en el hipocampo (FERGUSON y BOWMAN, 1990). En el mismo sentido, estudios con ratas Fischer, han observado que este deterioro es dosis-dependiente, selectivo y permanente, afectando a las vías colinérgicas del hipocampo (BOOZE y MACTUTUS, 1990). Por otro lado, el tratamiento crónico (45 días) con acetato de plomo (0.2 ó 1.0 mg/kg/día) en ratas produce un incremento de los niveles cerebrocorticales de ACh, que se mantiene incluso 28 días después de retirado el tratamiento (HRDINA y cols., 1976).

-Otros autores apuntan la posibilidad de que este metal ejerza sus efectos tóxicos a través de la acción sobre el sistema de opiáceos endógenos, al menos cuando la exposición al plomo se produce perinatalmente (JACKSON y KITCHEN, 1990). Estos mismos autores, en investigaciones posteriores, han confirmado estas observaciones al demostrar el efecto del plomo tiene sobre el "síndrome de retirada" en drogas como la morfina (KITCHEN y KELLY, 1993). A altas dosis de plomo y altas dosis de morfina, los animales manifestaron un menor número de síntomas típicos del síndrome de retirada: perdieron menos peso y tuvieron menores sacudidas.

Pero, a pesar de que, como acabamos de ver, la exposición crónica al plomo ha demostrado tener efectos sobre la capacidad funcional de los sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, adrenérgicos y de los opiáceos endógenos (SILBERGELD y cols., 1980), los mecanismos por los cuales se ejerce esta influencia, son aún poco conocidos.

Recientes estudios vinculan este efecto al papel de las proteínas G (SINGH, 1993). La exposición crónica a plomo afecta la capacidad funcional de varios receptores alterando las proteínas G presentes en el cerebro de ratas en desarrollo (LESLEY y cols., 1984). Hay dos tipos de proteínas G: estimuladoras o inhibitoras, que tan sólo se diferencian en la estructura de la subunidad alfa y que regulan la función de los receptores estimulando o inhibiendo la actividad de las proteínas efectoras. El plomo en exposición crónica y perinatal, retrasa el decremento que aparece con la edad en: la expresión de mRNA, la ribosilación de ADP y la fotoafinidad de la subunidad alfa inhibitora. Además, también se observa que estos cambios en las neuronas no se producen cuando la exposición al tóxico tiene lugar en la edad adulta. Por lo tanto se sugiere que la exposición crónica al plomo altera el desarrollo normal de la función de la proteína G inhibitora en las neuronas de animales jóvenes. Así pues, la exposición perinatal y crónica al plomo puede alterar la capacidad funcional de los receptores del SNC, alterando la ontogénesis de las proteínas G inhibitoras y/o la interacción de la proteína G con los receptores (LESLEY y cols.,

1984; SINGH, 1993). Dado que las proteínas G están emparejadas a receptores colinérgicos, adrenérgicos, glutaminérgicos y de opiáceos, la acción del plomo sobre estos sistemas de receptores podría estar mediada por su efecto con las proteínas G.

### ***CAPITULO 3.***

## ***EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE LA INTERACCION ETANOL-PLOMO.***

En esta sección realizamos una revisión de los estudios que, con anterioridad al presente trabajo, se han llevado a cabo utilizando conjuntamente plomo y etanol.

Los primeros estudios que aparecen y que dieron pie posteriormente a la investigación en laboratorio, son los realizados sobre muestras de trabajadores en fábricas que utilizan el plomo. En estas fábricas se realizaban periódicamente controles médicos para mantener las condiciones de salud del personal en unos mínimos legales. La imposibilidad de extraer conclusiones que relacionen de una manera causa-efecto los niveles de plomo y de alcohol detectados en estos trabajadores (por razones éticas no se puede controlar ninguna variable, sino tan sólo observar y registrar) planteó la necesidad de los estudios en animales de laboratorio donde la intervención es posible.

En los estudios experimentales llevados a cabo en animales, aparecen resultados muy variados. Estos dependen, no sólo de la forma de administración de ambas sustancias (crónico vs. agudo), sino también del periodo evolutivo en el que se encuentran los sujetos experimentales en el momento de serles aplicado el tratamiento (perinatal, jóvenes o viejos) y de las dosis utilizadas para cada droga.

A continuación se exponen los efectos de la interacción de ambas sustancias, en primer lugar, sobre los mecanismos bioquímicos que subyacen a la interacción, para después revisar las repercusiones conductuales.

### **3.1. Estudios bioquímicos y fisiológicos.**

La influencia general del etanol en el metabolismo de sustancias extrañas al organismo es un hecho bien conocido. En general, el etanol, ha demostrado potenciar la génesis de carcinomas, mutaciones y hepatotoxicidad que producen ciertos compuestos químicos (FLORA y TANDOM, 1987). En este sentido existe numerosa evidencia de que el alcohol interacciona de alguna forma, aún no bien conocida, con el plomo. Dicha interacción parece ocurrir en ambas direcciones: el alcohol altera el curso de los procesos fisiológicos desencadenados por la exposición continuada al metal y a la inversa, el plomo modifica ciertas variables bioquímicas y fisiológicas que median en los efectos conductuales inducidos por el alcohol, haciendo por ejemplo, que aumente el consumo de éste y convirtiendo así, al plomo, en un factor de la problemática alcohólica.

En el caso de los estudios sobre el tema realizados con **humanos**, se ha demostrado que las personas alcohólicas son más susceptibles a los efectos del plomo y que los trabajadores expuestos durante un mayor periodo de tiempo y con un grado mayor de exposición industrial al tóxico, muestran un aumento substancial del consumo de etanol en relación a sujetos no contaminados por el metal (FLORA y TANDOM, 1987).

Uno de los trabajos clásicos que inició el estudio de esta interacción tomando como punto de partida los efectos del plomo en el organismo fue el de Sharper y cols. en 1982. Dicha investigación fue realizada en diferentes ciudades inglesas con una muestra de hombres de mediana edad. El objetivo de este estudio era la búsqueda de posibles factores desencadenantes de mortalidad cardiovascular. Se había observado que en las zonas donde el agua era "blanda" este tipo de patologías coronarias era más elevado y se sugería que la mayor concentración de plomo en este tipo de agua era la responsable de las diferencias. Junto a ello, dos factores: tabaco y alcohol, jugaban un papel potenciador del aumento de los niveles de plomo en el organismo. Este trabajo tuvo en cuenta los siguientes parámetros: Ingesta de alcohol persistente durante años, clase social, masa corporal, consumo de tabaco y las concentraciones de plomo en el agua de cada ciudad. De todos estos factores, fue el alcohol el que demostró tener una mayor relación. El aumento de plomo en sangre era debido a que el alcohol afectaba la capacidad del hígado para excretar el plomo, aumentando así el nivel del metal que circulaba por la sangre (SHARPER y cols., 1982).

Sharper había comparado sus resultados con estudios en trabajadores expuestos a plomo en Dinamarca y Francia (MAGID y HILDEN, 1975; VIVES y LAPINSKI, 1980) que se encontraban afectados de cirrosis u otro tipo de alteraciones hepáticas

producidas por un elevado consumo de alcohol. Sin embargo en el estudio de Shaper se pudo llegar a las mismas conclusiones partiendo de sujetos sin deterioros hepáticos graves ni problemas de alcoholismo. Una ingesta socialmente aceptable de alcohol afectaba ya, el metabolismo del plomo.

A pesar de que exista la posibilidad de un contacto ocasional con el plomo (como en el anterior estudio) la mayor parte de la toxicidad manifiesta por el plomo resulta de la exposición ambiental e industrial que se sumaría al aporte dietético. En este sentido y desde hace años, existen diferentes grupos de investigadores que han abordado el estudio de las implicaciones que este tóxico tiene en la salud integral de los trabajadores de las industrias que trabajan con plomo o con alguna de sus sales. Estos trabajos han abordado las repercusiones e interacciones de este metal con múltiples factores, abriendo así muchas vías de investigación.

Waldenström y cols. (1942), en Suecia durante los años 40, desarrollaron métodos semicuantitativos para determinar los niveles de plomo a través de marcadores en orina (SHARPER y cols., 1982). Estos métodos fueron utilizados durante las siguientes dos décadas por el grupo de Odin (1934), también en Suecia, para controlar el plomo en los trabajadores de una conocida empresa de baterías. Gracias a tales controles se llegaron a recoger datos de 600 trabajadores, 200 de ellos con altos niveles de plomo en orina, que han servido para sugerir ciertos factores responsables de potenciar la toxicidad que causa este metal (SHARPER y cols., 1982). Algunos de estos factores son: El uso del tabaco en el lugar de trabajo, los hábitos dietéticos, el tiempo de ocio al aire libre y el consumo de alcohol. En relación a este último, se sabía que los individuos que consumen sistemáticamente alcohol, muestran en el control rutinario de los niveles del plomo, niveles más altos del metal. Se observó que todos los trabajadores se negaban a pasar el control de plomo durante la "resaca". Esto era así porque los trabajadores se habían dado cuenta de que si se les pasaba el control rutinario de los niveles de plomo tras la intoxicación con alcohol, el resultado eran niveles excesivamente altos de plomo y esto les conducía a una baja laboral.

Uno de los estudios que analiza todos los factores arriba descritos es el de Cramer (1966), que continuó la labor emprendida por el grupo de Odin. Cramer estudió los hábitos de vida de trabajadores expuestos a plomo, unos que manifestaban envenenamiento y otros que no. Este autor introdujo nuevos métodos, más precisos para detectar los niveles de plomo en orina: Las determinaciones del ALA (ácido- $\delta$ -aminolevulínico) son una buena estimación del plomo activo metabólicamente en el organismo. La enzima ácido- $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD) es inhibida por la

exposición crónica a plomo (TANDOM y cols., 1997). Esta enzima es la responsable del metabolismo del ALA y por lo tanto su mayor acúmulo y excreción son una consecuencia de los efectos del plomo.

Según los resultados de este estudio, (CRAMER, 1966) ni el tiempo de ocio, ni las diferencias en la alimentación, ni el consumo de tabaco se relacionaban con la frecuencia del envenenamiento por plomo. Sin embargo, las diferencias entre aquellos trabajadores que no consumían alcohol y los que eran fuertes bebedores (75 cl o más por mes) estaban muy claras. El etanol demostró incrementar la absorción del plomo en el cuerpo .

En relación a estos resultados que vinculan el consumo de alcohol y la intoxicación plúmbica en trabajadores de industrias cerámicas, otros autores (CANDELA y cols., 1991) han intentado valorar los efectos del alcohol sobre algunos indicadores biológicos de plomo tales como: Niveles de plomo en sangre y ALA. Estos trabajos demuestran que, a igual tiempo e intensidad de exposición al plomo, los sujetos que consumían más alcohol tenían mayores índices en los tres indicadores, que aquellos sujetos que consumían menos alcohol.

Otros grupos de investigadores (SUGAWARA y cols., 1991), que utilizan también como muestra trabajadores expuestos a plomo, han estudiado los aspectos farmacocinéticos implicados en la citotoxicidad inducida por el plomo, así como ciertas enzimas que protegen contra la peroxidación de las membranas celulares. Sus resultados indicaban que la exposición crónica al metal disminuía los niveles de estas enzimas, aumentando así la hemólisis y la lipidoperoxidación en los eritrocitos.

Todos estos estudios (CRAMER, 1966; SHARPER y cols., 1982; CANDELA y cols., 1991; SUGAWARA y cols., 1991), la mayoría de los cuales provienen de los controles llevados a cabo por los gabinetes de salud de las empresas, ponen de manifiesto la importancia no sólo de controlar los niveles de plomo en el organismo, sino también de controlar algunos factores que potencian y agravan los efectos tóxicos del metal en el mismo; entre ellos, el alcohol. Como hemos visto, el consumo de alcohol, interacciona con los indicadores de toxicidad plúmbica como el ALA, o el plomo en sangre y repercute en los sistemas antioxidantes celulares de manera que se desencadenen muchos problemas derivados de este desajuste enzimático.

Como consecuencia de las observaciones realizadas en los trabajos con humanos donde se apreció la interacción plomo-etanol, se plantearon los estudios de laboratorio

con **animales**. En estos, una de las constantes metodológicas ha sido la exposición crónica al metal previa a la administración del alcohol.

Para explicar esta interacción, se han propuesto diferentes mecanismos:

Una posibilidad de interacción apuntada se centra en las acciones de ambas sustancias sobre las neuronas dopaminérgicas del núcleo accumbens. La exposición crónica al plomo produce una disminución de los niveles de DA en el accumbens (MISSALE y cols., 1984), mientras que la administración IP de etanol aumenta los niveles extracelulares de DA en este área cerebral (YOSHIMOTO y cols., 1992; YOSHIMOTO y KOMURA, 1993). Asimismo, los niveles basales de dopamina en dos estirpes de ratas seleccionadas por su preferencia al etanol, indican que es menor la línea base de las "altas-bebedoras" que la de las "bajas-bebedoras" (GONGWER y cols., 1989). Según estos autores, dado que la cepa "altas-bebedoras" tiene un nivel bajo de DA, podría ser que tendiera a compensarlo aumentando la ingesta de etanol. De acuerdo con esta hipótesis, las ratas (no importa de qué cepa) expuestas crónicamente a plomo podrían ver disminuido su nivel de DA, por lo que la ingesta de etanol supondría un efecto compensador al inducir los niveles de este neurotransmisor.

Otros estudios de las variables bioquímicas afectadas por la coexposición plomo/etanol en el cerebro de ratas, indican que la exposición simultánea a ambas sustancias produce una mayor depresión de los niveles de DA y 5-HT en relación a las que sólo fueron tratadas con plomo (FLORA y TANDOM, 1987.).

Como ya mencionamos, el plomo se comporta como un antagonista de los canales de Calcio tipo-L (SIMONS, 1993). Estos canales están implicados en la expresión de muchos de los efectos psicoactivos del etanol. Se ha observado que *in vitro* el alcohol provoca alteraciones en los canales L tras exposición crónica, facilitando la entrada de calcio en la neurona (RIUS y cols., 1987). La tolerancia desarrollada a la exposición crónica a etanol, está mediatizada por el aumento de dihidropiridina (un antagonista de los canales de Calcio tipo-L). Este antagonista prolifera en el cerebro de la rata, al tratarlo *in vivo* con plomo. Ambos datos apuntarían a que la contaminación por plomo puede alterar los efectos que produciría el etanol a través del papel antagonista de la dihidropiridina sobre los canales de calcio tipo-L. Estrechamente unido a todo lo anterior estaría el dato de que, la nimodipina, una sustancia que tienen efectos antagónicos sobre estos canales, hace que se reduzca la liberación de DA que provocarían algunas drogas en el núcleo accumbens (NATION y cols., 1993). Todo ello



sugiere que las posibles relaciones entre el plomo, la DA y el etanol, están mediadas por el calcio.

Por otro lado, como ya se ha comentado previamente, se ha descrito que **el plomo**, al igual que otros metales pesados, al inducir la peroxidación de lípidos de las membranas celulares, **cambia la actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes de la célula; la catalasa cerebral y la superóxido dismutasa** (SOMASHEKARAI AH y cols., 1992; SUGAWARA y cols., 1991). También se ha sugerido que la enzima catalasa junto con el peróxido de hidrógeno puede metabolizar directamente etanol en el cerebro (COHEN y cols., 1980; ARAGON y cols., 1992a,b; 1991). Y como ya se ha comentado, varios laboratorios han sugerido que la actividad de la catalasa encefálica puede tener una función en los efectos neuro y psicofarmacológicos del etanol (ARAGON y cols., 1989; 1991; 1992a,b; ZIMATKIN y DEITRICH, 1997; SMITH y cols., 1997).

Otra posible explicación planteada por ciertos autores (MAHAFFEY y cols., 1974), sugiere que el sinergismo entre el consumo de alcohol y la intoxicación por plomo, clínicamente observado entre trabajadores de algunas industrias, es más bien debido a factores nutricionales que a la mutua potenciación de los efectos celulares de ambos tóxicos. Las alteraciones en el metabolismo producidas por el plomo podrían provocar un aumento de la ingesta de etanol como fuente de calorías, para paliar así las carencias nutricionales (SPLITER, 1984). En contra de esto, aparte de los estudios con humanos ya mencionados (CRAMER, 1966), estarían diversos trabajos realizados con roedores (BOOZE y cols., 1990; NATION y cols., 1986; SINGH, 1993) en los que el control de los pesos corporales de animales sometidos a una dieta que contenía plomo no difirieron significativamente de los sujetos con una dieta normal, hecho que no apuntaría hacia la hipótesis de la mala nutrición.

Otro hecho a tener en cuenta es el deterioro renal. Investigaciones previas realizadas acerca de la toxicidad del plomo en animales, han demostrado que los riñones son unos de los órganos más afectados por el deterioro de tejidos causados por el plomo (CHOIE y cols., 1980). Consecuentemente, el deterioro renal en animales expuestos a una cantidad suficiente de plomo como para producir daño renal, podría predisponerlos a incrementar el consumo de fluidos para mantener un nivel óptimo de volumen corporal de agua. Sin embargo esto no explicaría el hecho de que sea el alcohol el fluido elegido para paliar estas condiciones hipovolémicas. Asimismo, estudios como los citados anteriormente (NATION y cols., 1986), ponen de manifiesto que el volumen de fluido ingerido por los animales no es mayor en los que estaban

sometidos a una dieta con plomo de los que carecían de ella. En estos últimos estudios las concentraciones de plomo utilizadas (500 ppm) no son suficientes para producir daño en el riñón, pero sí como para mantener una concentración suficiente en sangre y afectar a diferentes tipos de conductas.

### 3.2. Estudios conductuales.

A continuación se relacionan una serie de resultados obtenidos a partir del estudio de la interacción plomo/etanol sobre parámetros conductuales. Todos los trabajos, salvo el que evalúa el efecto sobre la narcosis, se han realizado administrando el plomo de manera crónica. En cuanto a las vías y modo de administración del etanol podemos distinguir entre los estudios de ingesta de alcohol donde el consumo del mismo es crónico y el resto de estudios donde se administra el etanol de manera aguda.

**Ingesta y Preferencia por el Alcohol.** En estudios con **humanos** se han encontrado correlaciones significativas entre niveles altos de plomo en sangre y consumo diario de alcohol (SHARPER y cols., 1982). Las personas alcohólicas son más susceptibles a los efectos del plomo. Así mismo, los trabajadores expuestos durante un mayor periodo de tiempo y con un grado mayor de exposición laboral al metal, muestran un aumento substancial del consumo de alcohol en relación a sujetos no contaminados (CRAMER, 1966; FLORA y cols., 1987).

Los trabajos ya clásicos de Cramer (1966) en trabajadores de fábricas de baterías, encontraban correlaciones significativas entre la existencia de intoxicación por plomo y un alto (75 cl o más de licores de alta graduación por mes) consumo de alcohol. Este autor ya indicaba que la interacción era debida a "factores personales" ya que no había una interferencia del alcohol en el metabolismo del plomo al menos en las variables bioquímicas por él medidas (ALA mg/dl de orina). En la época en que se realizó este estudio (1966) los niveles de plomo considerados tóxicos estaban muy por encima de los considerados actualmente; en la actualidad un nivel significativo de plomo en orina sería 35  $\mu\text{mol/l}$  (CEZARD y cols., 1992) cuando en el estudio de Cramer 74  $\mu\text{mol/l}$  era un nivel normal.

En el estudio donde la muestra provenía de población no expuesta a condiciones laborales de contacto con el plomo (SHAPER y cols., 1982), se mostraba que existe una correlación positiva entre la cantidad de plomo en sangre y la ingesta diaria de alcohol: sujetos que alcanzaban valores de plomo en sangre entre 0.8 y 1.7  $\mu\text{mol/l}$  (16 a 34.1  $\mu\text{g}$

/ dl) (límite de la CEE marcado como el máximo permisible para considerarse que hay intoxicación por plomo), consumían más de seis bebidas alcohólicas diarias. En esta muestra el contacto con el metal se daba principalmente a través del contenido en plomo que tiene el agua corriente de algunas zonas (agua "blanda" ácida).

En estos trabajos se partía de la idea de que el alcohol interfiere con el metabolismo del plomo existiendo una correlación positiva entre ingesta de alcohol y niveles de plomo (ya fueran en orina o en sangre). Sin dejar de ser cierto este planteamiento (al menos cuando se analizan los datos que corresponden a niveles altos de plomo en el organismo), los nuevos trabajos sobre la interacción se plantean en qué medida la relación es a la inversa: El contacto con el metal causa un aumento en la ingesta de alcohol. Esta idea sería de especial interés si consideramos que este tipo de contaminación se sumaría así, a los factores implicados en la adicción al alcohol.

Con este último planteamiento aparecen estudios en **animales** que tratan de comprobar que la toxicidad producida por el plomo no es potenciada cuando se da conjuntamente a la ingesta crónica de alcohol en condiciones en las que los nutrientes y la energía aportados por la dieta están controlados (CHOIE y cols., 1974). En estos estudios sólo se apreció un incremento de la concentración de plomo en los riñones de aquellos animales donde no se compensaban los nutrientes y las calorías en la dieta en relación al grupo en la que sí se controlaban. El resto de órganos estudiados no manifestaban un aumento en los niveles de plomo depositados en ellos causado por la ingestión de alcohol.

En general en los estudios realizados en animales, también ha sido observado un incremento en el consumo de alcohol tras la exposición experimental a plomo. Los animales expuestos a tratamientos crónicos con plomo (500 ppm en la dieta) consumían mayores cantidades de alcohol que los animales control en una situación de acceso restringido, donde el único fluido disponible era una solución de etanol al 15%. Los mismos resultados se obtienen cuando se le permite al animal elegir el fluido (alcohol o agua) (NATION y cols., 1986). Esta mayor ingesta de alcohol no se correspondía con una cantidad mayor del fluido total ingerido (en el caso de libre elección), por lo que no se podría explicar como una compensación de fluidos causada por un posible daño renal. Por lo tanto, a la luz de estos datos, los autores sugieren la posibilidad de considerar la interacción plomo-alcohol a nivel del SNC. El plomo modularía el efecto producido por una sustancia adictiva como el alcohol, modificando sus propiedades psicofarmacológicas. De este modo los sujetos ingerirían más alcohol por la

disminución de sus propiedades reforzantes, ya sea refuerzo positivo o refuerzo negativo.

Los mismos autores en un estudio posterior (NATION y cols., 1987) observan el mismo efecto de aumento de la ingesta de etanol en los animales tratados con plomo, en un paradigma de evitación activa. En este caso los animales tratados con plomo demostraron beber más alcohol (al 15% v/v) cuando se les administró como único fluido en los días previos al test (método para introducirlos en el consumo de alcohol). Durante los días del test de evitación, en los cuales el consumo de alcohol era por libre elección, los animales tratados con plomo también ingirieron más alcohol que los control durante el intervalo en que duraba la prueba. En este caso se utilizaba un estresor ambiental potente (shock eléctrico en las patas) y los sujetos tratados con plomo ingerían más alcohol durante la prueba en que el estresor era aplicado, por lo tanto, según estos autores, los animales beberían etanol en un intento de paliar los efectos aversivos del shock: por refuerzo negativo. Esta conclusión parece más clara si tenemos en cuenta que los animales con plomo en la dieta también realizaron un número mayor de respuestas operantes para evitar la administración del shock, aunque recibieron el mismo número de ellos lo que demuestra que no daban más respuestas eficaces que el grupo control. Ante estos resultados los autores interpretan que el plomo podría interferir en el metabolismo del etanol **disminuyendo así sus propiedades ansiolíticas.**

Otros trabajos, han defendido que la elevación en el consumo voluntario de alcohol que el plomo produce, podría deberse a la **reducción de los efectos incentivos de la droga**, de tal forma que los animales consumirían más alcohol para compensar precisamente la disminución del valor reforzante inducida por la exposición a plomo (GROVER y cols., 1993b).

Esta hipótesis se ha puesto a prueba utilizando paradigmas de autoadministración, en los que ratas deben presionar un palanca para obtener el alcohol. Aquellos animales expuestos a plomo de forma crónica disminuyen su tasa de respuesta en relación a los animales control, cuando la droga empieza ofreciéndose a bajas concentraciones (6% v/v). Sin embargo, en los mismos sujetos, cuando la concentración de etanol que pueden obtener con la respuesta operante alcanza el 32% v/v, los animales tratados con plomo muestran mayor preferencia por esta solución que los sujetos control (NATION y cols., 1991a). Esta respuesta bifásica en función de la concentración puede explicarse considerando que los efectos psicofarmacológicos de concentraciones bajas de alcohol pueden no ser discriminados por los sujetos tratados con plomo.

En resumen, todos los trabajos donde la variable independiente es el consumo voluntario de etanol y que administran plomo de manera crónica a ratas, observan un aumento del consumo en los animales tratados con plomo en relación a los animales control. La explicación de este fenómeno ha sido que el plomo interfiere con las propiedades psicofarmacológicas del etanol de manera que los animales consumen más alcohol para poder apreciar sus propiedades reforzantes ya sean de refuerzo negativo (disminución del estrés) o de refuerzo positivo (propiedades "euforizantes" o de incentivo). El hecho de que la ingesta de plomo aumente el consumo voluntario de alcohol podría deberse a la reducción de los efectos incentivos de la droga, de tal forma que se ha propuesto que los animales consumirían más alcohol para compensar precisamente la disminución de su valor reforzante producida por la exposición a plomo (NATION y cols., 1986). Asimismo, al actuar el plomo como un estresor, los sujetos deben aumentar el nivel de ingesta de alcohol, o consumir este a concentraciones más elevadas para obtener los efectos sedantes y de ansiolítico que esta droga posee.

Existen muchos estudios acerca de los efectos que el plomo y sobre todo el alcohol, tienen sobre la conducta social. Dentro de estas conductas la que más ha sido analizada es la **agresión** en sus diferentes subtipos. En humanos se ha demostrado que muchos de los casos de violencia familiar están relacionados con el abuso del alcohol (BOHMAN y cols., 1987). El alcohol administrado de manera crónica y a dosis moderadas y altas, potencia la conducta agonística en diferentes estirpes de ratas (PHILLIPS y cols., 1991) y en ratones en respuesta a un estímulo aversivo (TRAMILL y cols., 1981). En lo referente a los efectos del plomo también existen una serie de trabajos que muestran los efectos del plomo sobre diferentes tipos de agresión: maternal, predatoria, por dominancia, instrumental o "irritable" (BURRIGHT y cols., 1989; HAHN y cols., 1991). Según estos trabajos, la exposición a plomo incrementa la reactividad a los estresores y a la estimulación aversiva en general, e induce manifestaciones similares a los cuadros ansiosos.

En relación a la agresión, aparece un antagonismo del plomo sobre los efectos del etanol (DAVIS y cols., 1993a). En este estudio se utilizaba un paradigma de agresión elicitada como respuesta a un shock, por lo que se podría encuadrar dentro de la agresión como "irritabilidad". Los animales que eran tratados con ambas sustancias de manera crónica mostraban un número menor de respuestas agresivas en relación a los animales que recibían solamente uno de los dos tratamientos, igualándose con ello a los animales control (sin exposición a plomo ni a alcohol). En el caso de la duración de la

agresión estos animales también realizaban ataques más cortos que los tratados con plomo o los tratados con alcohol.

La explicación que apuntan estos autores propone un aumento de la "reactividad y emocionalidad" en los animales producida por la exposición al metal. En concreto postulan que el resultado obtenido de una mayor duración en los ataques observada en el grupo tratado sólo con plomo, es debido a una disminución de los umbrales de nocicepción: el tratamiento con plomo genera un mayor discomfort ante los estímulos aversivos (NATION y cols., 1987), por ello los animales ante un shock del que no podían escapar reaccionaron de una manera más violenta que los tratados con alcohol. Sin embargo, cuando ambas sustancias se daban conjuntamente el plomo actuaba contrarrestando los efectos que producía el etanol (NATION y cols., 1991).

Históricamente son bien conocidas y ampliamente utilizadas las **propiedades analgésicas del alcohol** a dosis moderadas y altas. Muchos estudios experimentales, tanto en humanos como en animales de laboratorio, realizados en nuestros días, corroboran estos conocimientos (WOODROW y cols., 1988). En algunos de los estudios revisados hasta este punto se sugiere como posible factor en la interacción plomo-etanol, una alteración por parte del plomo de los umbrales de nocicepción (DAVIS y cols., 1993c).

Burkey y cols., (1993) observaron que el plomo reducía las propiedades hipoalgésicas del alcohol cuando se utilizaba como modelo de analgesia la respuesta refleja de retirada de la cola ante una fuente de calor excesivo (*tail-flick*). Las ratas expuestas a plomo crónicamente y tratadas con una inyección aguda de etanol, redujeron significativamente su latencia en la respuesta de retirada comparadas con aquellos animales tratados únicamente con etanol. Este efecto fue observado para diferentes dosis de etanol, de manera que el plomo ejercía un desplazamiento hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta asociada con las propiedades hipoalgésicas del etanol. Estas dosis en los animales control (no tratados con plomo pero sí con etanol) prolongaron la latencia en la retirada de la cola de una manera dosis dependiente. Los animales que habían sido tratados con plomo y no recibieron etanol manifestaron las mismas latencias que los animales que no recibieron ningún tratamiento, en ningún momento tuvieron latencias más cortas que las ratas control, lo que en parte demuestra que el plomo por si mismo no afecta a los umbrales de nocicepción, al menos bajo estas condiciones experimentales.

El plomo únicamente en interacción con el etanol modificó los umbrales del dolor. Este dato está en la línea de la explicación de una interacción farmacológica entre ambas sustancias. En este paradigma se eliminan posibles factores contaminantes como deterioros en aprendizajes o factores motivacionales. La única variable que podría enmascarar estos resultados sería un deterioro motor. Sin embargo, este efecto no alteraría la explicación de que las interacciones se dan a nivel farmacológico ya que el plomo a estos niveles de exposición no altera la latencia del grupo plomo-salina en relación al grupo salina-salina.

Los estudios con paradigmas de **castigo condicionado** han acumulado más evidencia experimental para la hipótesis de la interacción farmacológica antagónica entre plomo y alcohol. En los procedimientos de castigo condicionado o conflicto, la misma respuesta lleva a la obtención de refuerzo y castigo, y por tanto se produce una supresión condicionada de dicha respuesta. En este caso, se trata de comprobar los efectos que la exposición crónica a plomo tiene sobre los efectos analgésicos o anestésicos del etanol (VOGEL y cols., 1980). Esta propiedad del etanol supone, a priori, que en un paradigma de castigo condicionado donde se aplique un shock como estímulo punitivo, aquellos animales que hayan sido inyectados con etanol a dosis moderadas o altas, serán menos sensibles al dolor o discomfort causado por el shock y por lo tanto serán menos sensibles a los efectos supresivos del castigo.

Estudios de este tipo han demostrado que inyecciones de alcohol previas al entrenamiento desinhiben la conducta de tal forma que los animales recibían mayor castigo. Sin embargo, aquellos animales que habían ingerido plomo crónicamente no aumentaban su tasa de respuesta (NATION y cols., 1991b). Los animales privados de agua podían acceder a una solución de agua con sucrosa. Tras realizar 20 lengüetazos de esta solución se les aplicaba una descarga eléctrica en la lengua. Los animales que recibieron etanol, a diferencia de los animales a los que se les inyectó salina, mostraron una tasa mayor de respuesta, pero entre los animales inyectados con etanol, aquellos que habían sido tratados con plomo recibieron significativamente menos descargas y ejecutaron menos lengüetazos que los tratados con una dieta control (NATION y cols., 1991a).

Los autores observan que este resultado no es debido a diferencias en la conducta operante, ningún grupo de animales da más lengüetazos que otro en una sesión previa de habituación donde no se administraba shock cuando los animales trataban obtener la solución con sucrosa. Tampoco los grupos tratados con plomo, tratan de beber más, con lo que se elimina el factor de la hipovolemia causada por el plomo, ni hay ningún grupo

que durante la fase de administración de plomo muestre diferencias en peso o en ingesta de comida. Ya que no existieron diferencias en la conducta de los dos grupos de animales inyectados con salina durante el test, se elimina la hipótesis de que el tratamiento con plomo incrementa la reactividad a la estimulación aversiva ya sea primaria o condicionada (FLYNN y cols., 1979; NATION y cols., 1982) al menos bajo estas condiciones experimentales y de tratamiento.

La explicación más parsimoniosa de los resultados de este experimento, visto que los animales tratados con plomo e inyectados con etanol antes de la sesión de castigo condicionado realizaron menos lengüetazos durante ésta, es que la interacción entre ambas sustancias se da a un nivel farmacológico: el plomo reduce las acciones del etanol alterando su metabolismo.

La reducción del valor reforzante del etanol en animales tratados con plomo se ha analizado en estudios donde se evalúa el efecto que la administración de etanol tiene sobre la **autoadministración de otros reforzadores** (GROVER y cols., 1993b). En los animales no tratados con plomo (control), inyecciones agudas de alcohol redujeron la tasa de respuestas operantes para la obtención de agua en situación de deprivación. En el caso de las ratas tratadas con plomo e inyectadas IP con etanol, apareció el mismo efecto que en los animales control hasta llegar a dosis altas de alcohol donde la tendencia se invirtió y los animales tratados con plomo dieron un mayor número de respuestas para conseguir el reforzador (el agua).

Estos y otros autores proponen una explicación más específica para la interacción conductual plomo-alcohol: el plomo interacciona a nivel farmacológico con el etanol reduciendo sus propiedades reforzantes sobre el circuito cerebral más ampliamente señalado como el lugar de acción de los reforzadores: Haz prosencefálico medial - Núcleo accumbens (GROVER y cols., 1993b; DAVIS y cols., 1993c).

La **actividad locomotora** es una conducta ampliamente utilizada como "*screening*" para explorar efectos e interacciones farmacológicas. Sin embargo, son pocos los estudios que han explorado los efectos de la coexposición a plomo y a alcohol o a otras drogas. Uno de estos trabajos se vale de la coexposición a plomo y etanol de manera crónica durante el periodo prenatal (ZAJAC y cols., 1990) y no obtuvo datos muy concluyentes. En este estudio se utilizaron dosis de plomo que produjeran niveles del metal, aceptables como normales, en la sangre de las madres y una dosis de alcohol muy baja que no indujera conducta. La descendencia de las madres que habían recibido ambas sustancias, únicamente mostró una mayor latencia en iniciar conductas



exploratorias, en relación a aquellos animales cuyas madres habían recibido, únicamente, una de las dos drogas. El resto de los parámetros que se midieron, relacionados con actividad motora (erguimiento y distancia recorrida) analizados utilizando un sistema automatizado de caja de actividad, no resultaron diferentes entre los grupos control y experimental. Los autores explicaron los resultados como un aumento del temor de los animales y/o disminución de la motivación por explorar.

El único estudio conductual que ha utilizado la administración aguda de plomo y de etanol, ha utilizado la **narcosis** o pérdida del reflejo de enderezamiento en ratas para evaluar la interacción (SWARTZWELDER, 1984). Al igual que en el caso de la actividad locomotora, este es un buen paradigma para estudiar la interacción farmacológica de cualquier sustancia con el etanol ya que es una conducta en la que no intervienen tampoco factores motivacionales o de aprendizaje. Aunque se conoce poco acerca de los mecanismos centrales que regulan esta conducta, está ampliamente descrito que dosis agudas y altas de etanol producen narcosis, tanto en animales de laboratorio como en humanos (TICKU y KULKARNI, 1988). El plomo administrado de forma aguda dos semanas antes de la realización del test, antagonizó los efectos hipnóticos del etanol (SWARTZWELDER, 1984). En este estudio los animales expuestos a plomo mostraron no sólo una disminución en el tiempo de narcosis inducida por el etanol, sino también una latencia más larga en la pérdida del reflejo de enderezamiento.

Por tanto, la administración aguda de ambas sustancias también resultó en un antagonismo conductual, al igual que ocurrió en las conductas (agresión, analgesia. etc) donde la administración del plomo fue crónica y el etanol se administró de manera aguda.

***DESARROLLO  
EXPERIMENTAL***

## ***CAPITULO 4.***

### ***OBJETIVOS.***

#### **4.1. Objetivo General.**

En función de la literatura revisada hasta la fecha y de los resultados observados en algunos estudios previos, nuestro **objetivo principal es examinar el papel de la enzima catalasa cerebral en relación a las conductas inducidas por el etanol.**

Este objetivo será posible en la medida en que seamos capaces de demostrar variaciones conductuales a partir de la manipulación farmacológica de la actividad de la catalasa cerebral. Concretamente en la serie de experimentos que se presentan a continuación, se evalúa la influencia que un metal pesado como el plomo, tiene sobre la actividad de la mencionada enzima y como esto se relaciona con cambios en dos de las conductas inducidas por etanol: actividad locomotora y narcosis.

A fin de cumplir dicho objetivo hemos establecido un diseño experimental que creemos resulta adecuado para tal fin. Este, en tanto que pertenece a una investigación psicobiológica, incluye tanto medidas conductuales como bioquímicas. Respecto a las primeras, en este caso, se ha elegido la actividad locomotora y la narcosis como variables dependientes. Esta decisión está motivada por la objetividad y facilidad de registro de estas conductas, ventajas estas que las han consolidado como procedimientos ampliamente utilizados en la farmacología conductual (KELLEY, 1993). También porque constituyen conductas que manifiestan aspectos opuestos de la farmacología del etanol: los aspectos activadores y los represores.

En relación a las variables bioquímicas, tienen como fin detectar cambios en la actividad del sistema enzimático que, supuestamente, modificamos con la manipulación farmacológica: la catalasa. Estos ensayos se centran en la determinación espectrofotométrica de la actividad catalítica de la catalasa. Las manipulaciones farmacológicas se realizaron mediante la administración del plomo principalmente, pero también del AT.

La existencia de una correlación significativa entre esta medida de actividad enzimática con la variable conductual, inducida por el etanol, permite considerar un vínculo entre ellas.

Con todo ello, aumentaremos de manera indirecta, la evidencia disponible acerca de la posible implicación del acetaldehído en la conducta ligada al etanol.

## **4.2. Objetivos Concretos.**

El plomo, como herramienta farmacológica, introduce un tipo diferente de estrategia en los estudios realizados hasta el momento sobre la implicación de la catalasa en las conductas inducidas por una administración aguda de etanol. Dicha estrategia es la **inducción o potenciación de la actividad de la enzima**. Este efecto potenciador se consigue con la administración aguda del metal. La inducción de la enzima catalasa debe traducirse en potenciación de la actividad locomotora inducida por etanol.

Con esta herramienta que potencia la actividad del enzima se contrastan las posibles **interacciones con otras drogas diferentes al etanol**, a fin de observar la especificidad del efecto de la interacción plomo-etanol en conducta.

También se va a demostrar que **el plomo** como inductor de la actividad de la catalasa, **antagoniza los efectos** (sobre la catalasa y sobre la locomoción inducida por etanol) **de inhibidores de probados efectos sobre la actividad de dicha enzima**. Para ello, utilizamos el AT por ser uno de los más ampliamente empleados y mejor descritos.

Junto a esto, dado que conocemos por la bibliografía que la **administración crónica del metal** puede producir los efectos opuestos en la catalasa, es decir **reducción de la actividad**, también se emplea esta forma de administración para aumentar las pruebas existentes acerca de los efectos de la inhibición farmacológica o genética de la actividad de la catalasa cerebral en relación a la conducta inducida por etanol.

Finalmente, se demuestra que el plomo como inductor y también como reductor de la actividad de la catalasa, afecta a la latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento y la duración de la pérdida de dicho reflejo inducidas por etanol. El

objetivo es demostrar que **la catalasa también está implicada en una conducta depresora e inducida por la administración aguda de etanol: la narcosis.**

### **4.3. Plan de Trabajo.**

A fin de cumplir los objetivos planteados, consideramos necesario dividir el trabajo experimental en cinco fases:

En la **primera** de ellas se abordó el efecto del acetato de plomo (100 mg/kg) administrado de manera aguda, vía intraperitoneal (IP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol y sobre la actividad de la catalasa encefálica. En primer lugar, se evaluó el efecto que el intervalo de tiempo entre los diferentes tratamientos pudiera poseer sobre ambas variables dependientes. Una vez determinado y fijado el intervalo en el cual el plomo producía más potenciación de ambas variables, realizamos un estudio de dosis de plomo y otro de dosis de etanol para observar si la potenciación de la actividad de la catalasa y/o de la actividad locomotora inducida por etanol se producían utilizando dosis diferentes de cualquiera de los dos productos. Junto a lo anterior, pusimos en relación los datos conductuales y de actividad de la catalasa para establecer el nivel de correlación de ambas variables. Como complemento realizamos una serie de estudios control que eliminasen posibles efectos tóxicos paralelos al efecto principal: control del peso corporal y del cerebro, niveles de etanol en sangre, acumulación de plomo en cerebro y actividad locomotora espontánea.

En una **segunda** fase experimental realizamos pruebas de especificidad del efecto del plomo en interacción con el etanol. Es decir, comprobamos que el plomo (bajo los parámetros experimentales de tiempos, dosis y vía de administración que demostraron ser efectivos para la potenciación de la conducta y de la actividad enzimática) sólo afectaba a las conductas inducidas por etanol y no por otras drogas estimulantes de la actividad locomotora.

En la fase experimental **tercera** se abordó el efecto de la administración de un inhibidor de la catalasa (3-amino-1,2,4-triazole) sobre la potenciación de la locomoción inducida por etanol que el plomo provoca. En este caso realizamos un estudio de la especificidad por la enzima. Por tanto, utilizamos un inhibidor de la enzima catalasa administrado conjuntamente a un potenciador de la catalasa, como había demostrado ser el plomo (administrado de manera aguda) en la primera fase experimental del presente trabajo. El antagonismo en los efectos de ambas sustancias se entendió como una

evidencia adicional de que el plomo provoca su acción sobre las conductas inducidas por etanol vía catalasa. Al igual que en la fase experimental primera, realizamos un estudio de dosis de plomo y de AT para ampliar la evidencia en favor de esta interacción. También se estableció una correlación entre los datos de actividad locomotora inducida por etanol y de actividad de la catalasa encefálica a las diferentes dosis de plomo y de AT. Como parámetros de control se realizaron pruebas de deambulación espontánea y de niveles de etanol en plasma.

En **cuarto** lugar, planteamos el tema de la administración crónica de acetato de plomo en su efecto sobre la actividad locomotora inducida por etanol y también sobre la actividad de la catalasa encefálica en ratones. El propósito fue establecer un nexo de unión entre los datos conductuales y bioquímicos presentes en estudios de otros laboratorios en relación a la interacción plomo crónico y etanol agudo, que parecían ser muy diferentes a los efectos de la administración aguda del metal. Es decir, el plomo administrado de manera crónica había demostrado producir una disminución de la actividad de la catalasa, por ello, utilizamos esta forma de administración del metal para reproducir el efecto sobre la enzima catalasa y para observar el efecto en actividad locomotora inducida por etanol. Exploramos la importancia que sobre las variables dependientes pudiera poseer el intervalo entre los diferentes tratamientos: plomo crónico-etanol agudo. Asimismo, estos efectos se pusieron en relación con los efectos sobre la actividad de la catalasa encefálica. Como complemento realizamos una serie de estudios que nos aportaran un mejor conocimiento de los posibles efectos tóxicos paralelos al efecto principal: control del peso corporal y del cerebro, de los niveles de etanol en sangre y de la actividad locomotora espontánea. Para finalizar este apartado, evaluamos en qué medida las acciones del plomo administrado por largos periodos de tiempo seguían manifestándose cuando el metal no estaba siendo incorporado al organismo. Así pues se registró la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de la catalasa encefálica tras diferentes días desde la retirada del tratamiento crónico con plomo.

Por último, una **quinta** fase experimental, se realizó con el fin de explorar el papel de las manipulaciones farmacológicas de la catalasa sobre otra conducta inducida por la administración aguda de etanol. La conducta elegida fue la narcosis o pérdida del reflejo de enderezamiento. En este caso la administración de altas dosis agudas de etanol tienen como resultado, no la activación conductual del animal sino, la depresión. Utilizamos los dos tipos de tratamientos empleados en los experimentos anteriores: plomo administrado de manera aguda y plomo administrado de manera crónica, para estudiar

un efecto conductual del etanol diferente a la actividad locomotora. Dado que ya se habían analizado la influencia de ambos tratamientos sobre la actividad de la catalasa, utilizamos las dosis e intervalos temporales que más efectivos habían resultado en inducir y en inhibir respectivamente la enzima.

## ***CAPITULO 5.***

### ***FASES EXPERIMENTALES.***

#### **FASE EXPERIMENTAL I.**

Efecto de una administración aguda de acetato de plomo en la actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la catalasa encefálica.

#### **FASE EXPERIMENTAL II.**

Especificidad del efecto de una administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

#### **FASE EXPERIMENTAL III.**

Efecto del inhibidor de la catalasa 3-amino-1,2,4-triazole en interacción con la administración aguda de acetato de plomo.

#### **FASE EXPERIMENTAL IV.**

Administración crónica de acetato de plomo: Efectos en la actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la catalasa encefálica.

#### **FASE EXPERIMENTAL V.**

Modulación de la actividad de la catalasa y efecto en la narcosis inducida por etanol.



***FASE EXPERIMENTAL I.***

***EFEECTO DE UNA ADMINISTRACION  
AGUDA DE ACETATO DE PLOMO EN LA  
ACTIVIDAD LOCOMOTORA INDUCIDA  
POR ETANOL Y EN LA ACTIVIDAD DE LA  
CATALASA ENCEFALICA.***

## **Introducción.**

Datos procedentes de diferentes laboratorios han demostrado el papel de la actividad de la enzima catalasa cerebral en la mediación de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol (AMIT y cols., 1986; HUNT, 1996; ZIMATKIN y DEITRICH, 1997). Esta enzima en conjunción con el peróxido de hidrógeno podría metabolizar etanol directamente en el cerebro. Asimismo, otros estudios han presentado pruebas que sugieren una significación biológica y conductual para este proceso metabólico central y por lo tanto cada vez obtiene más apoyo la idea de que el acetaldehído puede ser un importante regulador de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol (ARAGON y cols., 1986; 1991a, b; 1992; SMITH y cols., 1997).

Numerosas pruebas a favor de esta hipótesis han sido aportadas por el empleo de inhibidores de la catalasa como el 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT) (ARAGON y cols., 1989; 1991a,b; 1992; TAMPIER y cols., 1988; 1994). También han sido empleados animales mutantes con bajos niveles de catalasa (ratones acatalasémicos) (ARAGON y AMIT, 1991). Sin embargo, hasta el momento, no se ha utilizado ninguna herramienta farmacológica para potenciar la actividad de la catalasa encefálica, comprobando las repercusiones en las conductas inducidas por etanol que dicha potenciación supone.

En este sentido, el plomo surge como una posibilidad, ya que ha demostrado, directa o indirectamente, incrementar la actividad de la catalasa en diferentes estudios bioquímicos. En estos estudios encontramos, por ejemplo, que el plomo induce catalasa en el cerebro y cerebelo de ratas recién nacidas entre los días 6 al 16 después de su administración (VALENZUELA y cols., 1989). Estos resultados pueden estar relacionados con una potenciación de los procesos detoxificadores celulares en ambas regiones. Otros autores han mostrado que la administración de plomo a embriones de pollo incrementa la actividad de la catalasa cerebral a las 72 horas tras la administración del metal (SOMASHEKARAI AH y cols., 1992). Estos autores sugieren que la catalasa provee de un mecanismo eficiente contra la lípido peroxidación inducida por el plomo<sup>65</sup> en los embriones. También ha sido demostrada la proliferación de peroxisomas (cargados con catalasa reactiva) en el SNC de embriones de pollo a los 16 días de una intoxicación aguda con nitrato de plomo (De GENARO, 1987). Estos

hallazgos han sido explicados como un aumento en los procesos detoxificadores de las células y juntos sugieren que la exposición aguda a diversos compuestos de plomo resulta en un aumento de la actividad de la catalasa encefálica.

Por todo ello, en el presente experimento hemos determinado en qué condiciones experimentales se produce el mencionado efecto inductor del plomo sobre la catalasa cerebral. Para ello se exploraron el intervalo temporal y las dosis de acetato de plomo en los cuales se produce este fenómeno, utilizando como sujetos experimentales ratones adultos.

Asimismo, el posible efecto del plomo en la actividad de la catalasa debe ir acompañado por una modificación en alguna de las conductas inducidas por etanol, dados los antecedentes expuestos en el primer párrafo. Para verificar esto último utilizamos la actividad locomotora como una conducta que sirvió de parámetro, ya que ha sido ampliamente utilizada en los experimentos con inhibidores de la catalasa (ARAGON y AMIT, 1991; ARAGON y cols., 1993).

Una vez explorado el intervalo temporal en el cual se producían los efectos potenciadores del plomo sobre la catalasa y sobre actividad locomotora inducida por etanol exploramos la repetitibilidad del efecto con un amplio rango de dosis de plomo y de etanol. Es bien conocido que la actividad locomotora inducida por etanol en ratones, presenta una respuesta claramente bifásica (POHORECKY, 1977). Aunque se desconocen las razones por las cuales la deambulación inducida por etanol muestra este comportamiento bifásico en estos roedores pero no en otros (ratas, por ejemplo), algunos investigadores han señalado que diferentes partes de esta curva pueden responder a diferentes elementos de la cadena metabólica del etanol (CARMICHAEL y cols. 1991). El estudio de las dosis de etanol tuvo como objetivo demostrar que los efectos del plomo sobre la actividad locomotora no son casuales limitándose a una única dosis, así como evaluar si el plomo provoca efectos diferentes en las porciones ascendentes y descendentes de dicha curva bifásica.

La respuesta de dosis es una garantía para todo estudio psicofarmacológico que pretenda demostrar la solidez de un efecto, ya que cuando se realiza un adecuado análisis del efecto, la respuesta obtenida puede tomarse como una función y, con ello, es posible la aplicación de recursos estadísticos que posibilitan extraer una mayor cantidad de información que los aportados por experiencias de dosis única. Esta labor es aún más importante en este trabajo ya que uno de sus objetivos principales es la determinación de las condiciones bajo las cuales pueda emplearse el acetato de plomo

administrado de manera aguda como un potenciador de la actividad de la catalasa. En este sentido y dado que no hemos podido encontrar ningún estudio sistemático de dosis de plomo en relación a la actividad enzimática, pero tampoco en relación a su efecto sobre las conductas inducidas por etanol, el objetivo de este experimento fue intentar establecer un rango de dosis que, sin ser letales, ejerzan un efecto en ambos parámetros. Por tanto, evaluamos si los efectos del plomo en la actividad locomotora inducida por etanol varían, en respuesta a variaciones en la dosis de plomo, sin alterar la actividad espontánea. Estos datos, junto con los posibles efectos de dosis del plomo en la inducción de la actividad de la catalasa, permitirán ratificar la relación postulada entre ambas variables.

Finalmente, ya que uno de los objetivos principales de esta tesis es determinar las condiciones bajo las cuales puede usarse el plomo como un modulador de la enzima catalasa y verificar que esto se traduce en efectos sobre la conducta inducida por etanol, era imprescindible eliminar o minimizar los efectos deletéreos que dicho compuesto posee sobre otras variables conductuales como la actividad locomotora espontánea o el peso corporal. En este sentido, creímos necesario observar las repercusiones que puedan tener diferentes dosis de plomo sobre una variable fisiológica importante: el peso corporal. El peso es un indicador de muchas otras variables como podrían ser: el nivel de ingesta de líquidos y de alimento o la excreción de los mismos. El seguimiento de esta variable se realizó también a diferentes días y con diferentes concentraciones del metal. Junto a estos datos realizamos un control del peso total del cerebro a los 7 días de la inyección de diferentes dosis de plomo dado que existen precedentes (SAUERHOFF y MICHAELSON, 1973) que indican que uno de los efectos dañinos del plomo afecta a esta variable, al menos en animales jóvenes. En estudios de otros laboratorios sobre aspectos neurotoxicológicos de este metal (BOOZE Y MACTUTUS, 1990) se ha observado diferencias en el volumen y densidad celular de diferentes áreas cerebrales tras la administración del metal. Si bien en estos estudios la edad de los sujetos (ratas recién nacidas) era diferente a los empleados en nuestro trabajo, el hecho de que una sola inyección (SC) de tetraetilo de plomo produzca los mencionados cambios, nos llevó a explorar el efecto de diferentes dosis de acetato de plomo en la edad adulta sobre la supervivencia del tejido cerebral.

Otra serie de observaciones nos permitió descartar que los efectos del tratamiento con acetato de plomo se ejercieran a nivel periférico. Estas fueron, la concentración de plomo en tejido cerebral y la farmacocinética periférica del etanol tras una administración aguda de este alcohol en animales pretratados con plomo.

Determinamos la concentración de plomo alcanzada en el cerebro de los ratones tratados de manera aguda. El SNC está normalmente bien protegido (mucho mejor que otros tejidos) contra los efectos tóxicos producidos por los metales en general. Esta protección es debida a la barrera hematoencefálica. La capacidad del plomo para atravesar esta barrera por mecanismos de difusión facilitada es dependiente de la forma química de este metal, de la interacción con otros componentes del suero, de los fluidos corporales de algunos factores fisiológicos y bioquímicos y del estado general de salud del organismo (DABROWSKA-BOUTA y cols., 1996). En la literatura sobre el tema están ampliamente descritas las concentraciones de plomo en tejidos tras la exposición crónica al metal (NATION y cols., 1991a; 1993; CORY-SLECHTA y POKORA, 1991), pero poco se conoce sobre la acumulación de plomo tras una exposición aguda. El hecho de que el plomo esté presente en este órgano es considerado una prueba de que puede alterar diferentes variables o estructuras bioquímicas, algunas de ellas comunes con los lugares de acción del etanol.

Como control de la posible interacción del plomo con el etanol a niveles periféricos, realizamos una medición de los niveles de etanol detectados en la sangre de animales tratados con plomo e inyectados con etanol en relación a los niveles de animales únicamente inyectados con etanol.

Por lo tanto las hipótesis planteadas eran:

1.- El efecto del plomo en la actividad locomotora inducida por etanol iba a variar con la latencia entre el pretratamiento con plomo y el tratamiento con etanol. En los primeros momentos (horas e incluso días) a partir de la administración del metal se manifestarían los efectos más tóxicos de altas dosis de plomo en el organismo. Pasado este periodo las variables de control para la toxicidad (peso y deambulacion espontánea) deberían alcanzar los niveles normales en animales no intoxicados.

2.- El plomo provocaría una alteración en la actividad de la catalasa que en alguno de los intervalos temporales iba a suponer una potenciación de dicha actividad.

3.- El plomo, por sí mismo y en los intervalos temporales empleados en el presente trabajo, no iba a provocar ningún efecto en la actividad locomotora de aquellos animales a los cuales no se les administraba etanol. Otros parámetros de toxicidad que en este trabajo no se analizan, pueden estar afectados. Sin embargo, dado que no era nuestro objetivo explorar en detalle la toxicología del plomo, admitimos como "recuperación" la no afectación de una variable conductual como la deambulacion

espontánea en campo abierto, o la normalidad de una variable fisiológica como la evolución del peso corporal.

4.- El efecto del plomo en la actividad locomotora inducida por etanol varió con la dosis que de cada sustancia se administraba. Considerando la conducta como dependiente de la actuación del sistema enzimático catalasa (en tanto que responsable de la producción de acetaldehído), este sistema debía ser también dependiente de la concentración de las drogas utilizadas.

5.- Los efectos del plomo en la actividad locomotora y en los niveles de actividad de la catalasa cerebral a lo largo del tiempo presentarían una estrecha relación. En este sentido, y aunque una correlación no indica la dirección de ésta posible relación, parece más parsimonioso pensar que el plomo provoca una modificación de la actividad de la catalasa cerebral que se traduce, finalmente, en un descenso de la deambulación inducida por etanol. Este dato supondría un apoyo a la idea de que la actividad locomotora inducida por etanol puede considerarse dependiente de los niveles de acetaldehído y por tanto de los sistemas enzimáticos implicados en su síntesis.

## **Materiales y métodos.**

### **I. Estudios Conductuales.**

**Sujetos y Condiciones de Alojamiento.** Los animales utilizados fueron ratones albinos machos de la cepa Swiss (CFLP) (Harlan Sprague Dawley, Barcelona). A su llegada a nuestro laboratorio estos animales tenían cuatro semanas de edad y su peso promedio era de  $20 \pm 2$  gramos.

El mismo día de su llegada y tras el registro del peso los sujetos eran aleatoriamente alojados en grupos de tres o cuatro animales en jaulas de material plástico con lechos de serrín. La sala utilizada como estabulario mantuvo siempre una temperatura promedio de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con una humedad promedio del 55%. En dicha sala la luminosidad era siempre artificial y sometida a ciclos de 12 horas de luz y oscuridad.

Los animales pasaban siempre un mínimo de una semana en el estabulario antes de participar en cualquiera de los experimentos. Durante este tiempo dispusieron siempre de libre acceso (*ad libitum*) a comida y bebida. El alimento consistía en un preparado comercial especial para ratones (Panlab, S.L.). La bebida fue agua potable de uso corriente.

**Drogas.** Las sustancias empleadas en los tratamientos aplicados a los sujetos experimentales fueron administradas de manera aguda con una inyección intraperitoneal (IP). Son las siguientes:

- Acetato de Plomo (Panreac Química S.L.). Se preparó una solución de acetato de plomo disuelto en agua destilada a una concentración de 0.5 mg/ 10 ml. Las diferentes dosis empleadas fueron siempre tomadas de esta solución estándar.

- Solución Salina. Se preparó una solución de cloruro sódico (Panreac Química S.A.) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.9%.

- Etanol. Se preparó una solución de alcohol etílico de 96° (Panreac Química S.A.) al 20% v/v (21 ml en 100 ml de agua destilada). Las diferentes dosis empleadas fueron siempre tomadas de esta solución estándar.

- Ketamina. Se preparó una solución de ketamina (5 g en 10 ml) a partir de un preparado comercial (Imalgene, Rhone Merieux Labs.) del cual se tomaron 0.6 ml, que se disolvieron en 5.4 ml de agua destilada. Con este producto se anestesió a los ratones antes de ser sacrificados para la toma de muestras de tejido.

**Aparataje.** La actividad locomotora fue medida en un "Campo Abierto" consistente en un cilindro de cristal transparente cuyas medidas eran 25 cm de diámetro por 30 cm de altura. El registro de la conducta se realizó manualmente. El cilindro tenía dibujadas dos líneas perpendiculares en la base que delimitaban cuatro cuadrantes iguales. Se consideraba una cuenta cada vez que el animal cruzaba de un cuadrante a otro con las cuatro patas.

**Procedimiento.** Transcurrida una semana desde su llegada al laboratorio, durante la cual los animales se aclimataron a las condiciones del estabulario, los ratones se dividieron en dos grupos de igual número y se sometieron a las condiciones experimentales.

La fase experimental comenzaba con una administración aguda (IP) de acetato de plomo o de solución salina. Inmediatamente después de la administración del plomo, los animales eran devueltos a sus cajas donde permanecían alojados hasta el día de la realización del test. El día de la administración del plomo, los animales tenían 5 semanas de edad y su peso promedio era de  $32 \pm 3$  gramos.

El día del test los animales eran trasladados a la sala de conducta donde eran pesados individualmente y posteriormente sometidos a las condiciones experimentales del paradigma conductual. Los registros de actividad conductual se tomaron en una sala con luz indirecta suave y donde el ruido externo fue atenuado. En dicha sala, la temperatura se mantuvo en los mismos valores que la del estabulario,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . La evaluación conductual se realizó entre las horas 2 y 5 del periodo luminoso del ciclo circadiano de los animales.

Las sesiones de medición de la actividad locomotora comprendían un total de veinte minutos medidos inmediatamente después de la administración (IP) de la correspondiente dosis de etanol. Inmediatamente tras la inyección, cada animal era introducido individualmente en el campo abierto donde permanecía durante un periodo de 20 minutos. Los primeros 10 minutos fueron desechados del computo final para reducir el efecto de variables contaminantes (manipulación, novedad, absorción de las



drogas, etc.) (KELLEY, 1993; DUDEK y TRITTO, 1994). La medición de la actividad locomotora se realizó durante los últimos diez minutos.

En el primer experimento todos los animales recibieron un tratamiento (acetato de plomo o salina) y tras un tiempo fijado por el experimentador (1, 3, 5, 7, 9 u 11 días) fueron expuestos a un campo abierto. Inmediatamente antes del registro de la actividad locomotora, los animales eran inyectados con etanol o con una dosis equivalente de solución salina. La dosis de acetato de plomo utilizada para explorar la latencia entre la administración de plomo y el registro de la actividad locomotora, fue 100 mg/kg administrada una única vez vía intraperitoneal (IP). Elegimos, a priori, esta dosis de acetato de plomo porque en la literatura había demostrado no ser letal ni producir alteraciones fisiológicas o conductuales en aves (*larus argentarius*) (BURGER, 1990; BURGER y GOCHFELD, 1993). Comprobamos también en la clasificación de sustancias del MERK INDEX que esta dosis, administrada IP, en roedores no se acercaba a la dosis letal (BUDAVARI y cols., 1989). La dosis de etanol empleada en esta primera prueba (2.5 g/kg) fue elegida por ser la dosis que, en trabajos previos de nuestro laboratorio, demostró provocar la máxima inducción de actividad locomotora en la estirpe de ratones Swiss. Respecto a las latencias, se optó por una progresión aritmética para el estudio de los días, que finalizó una vez encontrado un tiempo a partir del cual la preexposición a plomo no presenta ninguna interacción con el etanol (hasta 11 días).

En el caso de la exploración de las dosis de etanol y de plomo se fijó el tiempo de latencia entre los dos tratamientos en 7 días. Para la exploración del efecto del plomo en interacción con diferentes dosis de etanol utilizamos siete dosis de etanol (0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 g/kg) y la dosis de 100 mg/kg de plomo. Para el estudio de las dosis de plomo fijamos la dosis de etanol en 2.5 g/kg y utilizamos cuatro dosis de plomo (0, 50, 100, 150 ó 200 mg/kg) para el estudio de los efectos sobre el peso corporal y cerebral o cuatro (las más bajas) para el estudio de la actividad locomotora.

## **II. Estudios Bioquímicos.**

Las variables dependientes registradas fueron los niveles de actividad catalítica de la enzima cerebral catalasa, los niveles de etanol en sangre y la acumulación de plomo en cerebro.

**Muestra.** Los ensayos bioquímicos fueron realizados a partir de cerebros congelados de animales iguales a los utilizados en las mediciones conductuales. En la evaluación de la actividad de la catalasa cerebral y de la concentración de plomo en cerebro se utilizaron muestra homogeneizadas de cerebros extraídos tras ser perfundidos (con 50 ml de una solución de cloruro sódico al 0.9% y 1000 unidades de heparina). Todos los utensilios empleados en la manipulación y almacenamiento de las muestras eran de materiales plásticos o teflón, para evitar posibles contaminaciones de otros metales. Las muestras fueron inmediatamente conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

En el caso de la determinación de etanol en sangre, esta se obtuvo del tronco del animal inmediatamente después de la decapitación. Previamente, los animales fueron anestesiados con ketamina (0.5 ml de la solución estándar). Para evitar la coagulación de la muestra, la sangre era depositada directamente en tubos independientes para cada muestra que contenían heparina (100 unidades en 50  $\mu\text{l}$ ). La conservación de la muestra se realizó por congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

#### **Productos químicos.**

- Heparina (Sigma Aldrich S.A.). Utilizada para evitar la coagulación de la sangre durante la perfusión o las determinaciones de etanol en plasma. En el primer caso se utilizaron 1000 unidades disueltas en un litro de una solución con agua destilada y cloruro sódico al 0.9%. Para las determinaciones de etanol la concentración empleada fue de 100 unidades en 50  $\mu\text{l}$ .

- Digitonina (Sigma Aldrich S.A.). Preparada al 0.01% utilizando en tampón fosfato. Esta solución se empleó como disolvente en el proceso de homogeneización.

- Fosfato Potásico (Panreac Química S.L.). Preparado en una disolución estándar de 6.81 g en 1000 ml de agua destilada.

- Fosfato Monosódico (Panreac Química S.L.) preparado en una disolución única de 8.9 g en un volumen total de 1000 ml. Esta dilución junto con la anterior fueron empleadas, en una proporción 1/1.5 respectivamente, en la preparación del tampón fosfato (50 mM), pH 7.0.

- Peróxido de Hidrógeno (30%. Sigma Aldrich S.A.). Preparado en una concentración de 5 mM (34  $\mu\text{l}$ / 5 ml de tampón fosfato). Utilizado como sustrato para la detección de la actividad enzimática.

- Azul Coomassie G-250 (Biorad S.A.). Este colorante fue preparado en una concentración 5x disuelto en etanol 96% (100 mg Coomassie en 50 ml de etanol).

- Acido orto-Fosfórico. (Panreac Química S.L.). La anterior preparación se disolvía en 100 ml de este fluido.

- Albúmina de Suero Bovino. (Sigma Aldrich S.A.) Diluida en agua destilada (15 mg/ 10 ml). Utilizada para la preparación de la curva patrón que permitirá la determinación de la cantidad de proteína contenida en la muestra.

- Acido Tricloroacético. (Panreac Química S.L.). Se preparó una solución al 6.25% w/v en agua destilada.

- Equipo Diagnóstico de Alcohol (Sigma Aldrich S.A.). Método enzimático para la determinación y cuantificación de etanol en suero o en sangre total.

- Disolución madre de Plomo (Titrisol, Merck) de 1000 ppm. Los patrones de trabajo fueron preparados para disoluciones sucesivas. El contenido final de ácido nítrico fue 1.1%.

- Acido Nítrico. (RA-ACS-ISO Merck). Utilizado en el proceso de digestión de las muestras.

### **Aparataje.**

Microcentrífuga para tubos eppendorf (ALC S.L.). Utilizada para la preparación de la muestra.

Espectrofotómetro modelo DU 640 (Beckman Co.). Las cubetas utilizadas poseían 10 mm de espesor y estaban fabricadas en cuarzo. Los reactivos utilizados fueron escogidos para evitar todo resto de metales pesados, confeccionándose con ellos un tampón de fosfato estándar (50 mmol/pH 7.0) y una solución de peróxido de hidrógeno (30 mmol/l) de acuerdo a la descripción de Aebi (1974).

El análisis de plomo fue realizado con un espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-800 con corrector de la señal de fondo de efecto Zeeman, equipado con un horno de grafito GTA-100 y dotado de inyector automático de muestra. El volumen inyectado fue siempre de 20  $\mu$ l. Se utilizó una lámpara de plomo de cátodo vacío, de alta densidad, que emitía a una longitud de onda de 283.3 nm y operaba a una corriente de 5 mA.

Para la digestión de los cerebros se utilizó un horno de microondas (O.I.- Analytical Microwave Digestion System), de radiación continua con una potencia de 950 vatios. Los reactores utilizados fueron de teflón y el sistema soportó una presión total de 20 bar.

### **Procedimiento.**

**Determinación de la actividad de la catalasa encefálica.** Los registros de la actividad de la catalasa fueron realizados por espectrofotometría ultravioleta. Este es posiblemente el método más preciso y sin duda uno de los más usados en la literatura (AEBI, H. 1974). Este método se basa en el seguimiento de la descomposición del peróxido de hidrógeno a partir del decremento en la absorbancia a una longitud de onda de 240 nm ( $\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Estas diferencias en la absorbancia, en relación a una unidad de tiempo, suponen una medida adecuada de la actividad de la catalasa.

Cada cerebro fue suspendido en digitonina (0.01%), con un volumen (ml) equivalente al 10% de su peso (expresado en gramos) para ser homogeneizado en un homogeneizador de 5 ml de capacidad con un pistón de teflón. De la solución resultante se tomó una muestra (1.7 ml) que fue sometida a centrifugación (10000 rpm /10 minutos). El sobrenadante (100  $\mu\text{l}$ ) de la centrifugación se añadió a 825  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato para ser utilizado como blanco en las mediciones de la actividad de la catalasa. Se realizó un blanco para cada ensayo y tres ensayos por muestra.

Cada uno de los ensayos se inició mediante la adición de 150  $\mu\text{l}$  de la solución de peróxido de hidrógeno (30 mmol/l) a la preparación anteriormente descrita como blanco. Tras esta adición, la cubeta se agitaba y era inmediatamente introducida en el espectrofotómetro para la medición. El ensayo se prolongó durante dos minutos promediándose las muestras obtenidas cada 15 segundos.

El valor final de la actividad de cada uno de estos ensayos fue promediado junto con otros dos idénticos, obteniéndose así una actividad final que a su vez era puesta en relación con la cantidad total de proteínas contenidas en los 100  $\mu\text{l}$  de la preparación de la muestra de cerebro homogeneizado.

Para la cuantificación de la cantidad total de proteína de la muestra se utilizó un método colorimétrico (BRADFORD, 1976) medido con el mismo espectrofotómetro con lámpara visible a una longitud de onda de 595 nm, en cubetas de vidrio de 3 ml de capacidad.

De este modo, la variable dependiente finalmente utilizada en la medición de la actividad de la catalasa fue la desaparición de peróxido de hidrógeno (expresada en mmoles) por cada miligramo de proteína en un minuto (mmoles de  $H_2O_2$  / min / mg proteína).

**Concentración de plomo en cerebro.** Estas mediciones fueron realizadas en colaboración con el laboratorio de Química Analítica de la U. Jaume I. Los cerebros, previamente desecados en estufa, fueron sometidos a digestión en un horno de microondas en un medio de ácido nítrico y agua oxigenada. El plomo en las disoluciones resultantes fue analizado por espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito (ETAAS). La cuantificación fue hecha por comparación directa con patrones acuosos.

Los cerebros, con una masa húmeda de aproximadamente 0.5 g, fueron desecados en estufa a 105°C hasta pesada constante (24 horas). Con este procedimiento se obtiene una pérdida, máxima y repetitiva, de masa del 80%.

La masa seca correspondiente a cada cerebro (entre 75 y 100 mg) fue pesada (con precisión de 0.1 mg) directamente en los reactores del microondas. A cada reactor se le añadió 2 ml de ácido nítrico y 1.5 ml de peróxido de hidrogeno. Después del proceso de digestión, quedó una disolución transparente e incolora que finalmente fue aforada a 25 ml. El blanco (reactivos) se sometió al procedimiento global (digestión y análisis) por quintuplicado, para conocer la señal de plomo que originaba.

Las disoluciones de trabajo fueron trasvasadas a los tubos de inyección automática del horno de grafito para ser analizadas. La cuantificación se realizó por calibrado directo con patrones acuosos acidificados con nítrico. El calibrado que se utilizó constaba de los siguientes patrones: 0, 10 y 30 ppb de plomo y se repetía cada 8 muestras siempre al final de cada serie. Cada conjunto de muestras fue cuantificado utilizando el calibrado que le precedía.

**Determinación de etanol en sangre.** Para la obtención de la muestra los animales eran anestesiados y sacrificados. La sangre troncal era recogida a continuación del sacrificio y tras un periodo de 15, 30 ó 60 minutos después de la inyección (IP) de la dosis de etanol (2.5 g/kg). Esta sangre (1.5 ml) era depositada en tubos eppendorf que contenían heparina para evitar la coagulación de la muestra. Los tubos eppendorf eran colocados en la microcentrífuga donde la muestra pasaba por una primera centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm. Del sobrenadante de esta centrifugación

se extrajeron 160  $\mu$ l ( con ello conseguíamos aislar el suero de los eritrocitos). Esta cantidad de suero se mezclaba con 1.44 ml de TCA al 20% para desnaturalizar las proteínas y posteriormente desproteinizar el suero. La mezcla de suero con TCA se mantenía 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente era centrifugada (5 min a 5000 rpm). El suero libre de proteínas resultante se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

El día de la determinación del etanol, se descongelaban las muestras y el contenido de etanol en sangre era determinado espectrofotométricamente (absorbancia a 340 nm). El equipo diagnóstico era un preparado que permitía cuantificar la cantidad de NADH formado durante la reacción enzimática llevada a cabo por la ADH y el cofactor NAD del preparado, sobre el etanol que contenía la muestra.

### **III. Análisis estadísticos.**

Todos los datos fueron analizados utilizando pruebas estadísticas paramétricas. En concreto en todos los experimentos de la presente fase se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) donde las variables fueron entre sujetos en todas las pruebas menos aquellas en las que se evaluó la evolución del peso corporal a lo largo de diferentes días. En esa prueba se aplicó un ANOVA de medidas repetidas. En los casos en los que se consideró necesario se aplicó un análisis *post hoc* de la interacción de los factores principales, para ver las diferencias entre grupos. Dicha prueba fue Fisher's Least Significant Difference Tests (LSD). Las tablas con los resultados de dichos análisis aparecen en el apartado de Apéndices.

La covariación de las medidas de actividad locomotora inducida por etanol y de actividad de la catalasa cerebral para los grupos sometidos al mismo tratamiento se cuantificó mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson.

El programa estadístico utilizado fue STATISTICA 4.1. para MAC.

## Resultados.

### 1.1. Actividad locomotora tras diferentes intervalos temporales.

En la figura 1.1. se muestran los resultados del efecto de la administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora espontánea e inducida por etanol en ratones. Para esta prueba utilizamos como única dosis de acetato de plomo 100 mg/kg y como única dosis de etanol; 2.5 g/kg, ambas inyectadas IP. Realizamos un diseño experimental en el que utilizamos cuatro grupos de tratamiento: Dos grupos fueron inyectados con solución salina y otros dos con acetato de plomo. El día de la medición conductual (1, 3, 5, 7, 9, u 11 días después de la administración de salina o acetato de plomo), uno de los grupos salina y otro de los grupos de plomo eran inyectados con etanol, a los otros dos se les administró una dosis equivalente de salina.

Los resultados de un ANOVA de tres factores: tratamiento (salina / acetato de plomo) x dosis de etanol (0.0 / 2.5 g/kg) x día (1/ 3/ 5/ 7/ 9/ 11), reveló un efecto significativo del factor tratamiento ( $F(1,216)=7.5$ ,  $p<0.01$ ) y del factor dosis de etanol ( $F(1,216)=244.4$ ,  $p<0.01$ ). También resultaron ser significativas las interacciones entre día y tratamiento ( $F(5,216)=2.3$ ,  $p<0.05$ ) por un lado y entre dosis de etanol y tratamiento, por otro ( $F(1,216)=6.1$ ,  $p<0.01$ ). Sin embargo, no fue significativo el factor días ni la interacción entre los tres factores.

Dado que existía una interacción entre días y tratamiento, esto nos indicaba que debía existir algún momento en que el plomo afectaba a la actividad locomotora, ya fuera esta espontánea o inducida por etanol. Para poder comprobar en qué grupos se producía una afectación de la conducta en relación a sus respectivos controles realizamos una prueba *post hoc* Fisher-LSD de la interacción de los tres factores. En primer lugar verificamos que la deambulación espontánea no se alteraba ningún día en los animales inyectados con plomo en relación a sus respectivos controles en el mismo día. Posteriormente comprobamos que en todos los días los grupos inyectados con etanol mostraban una actividad locomotora inducida en relación al grupo inyectado con salina que le servía como control. En todos los casos el nivel de significación de dichas diferencias estuvo por debajo de  $p<0.01$ . Finalmente, decidimos comprobar cuales eran los días en que los grupos inyectados con etanol, pero que habían tenido un tratamiento diferente (plomo o salina), eran diferentes entre sí. La prueba LSD indicó que en los días 5 y 7 los grupos tratados con plomo son significativamente diferentes ( $p<0.01$ ) del

grupo correspondiente tratado con salina. El resto de grupos tratados con plomo mostraron una deambulaci3n inducida por etanol estadisticamente igual que los grupos control. Unicamente apareci3 una significaci3n residual ( $p < 0.09$ ) el d3a 3.

Por lo tanto, podemos concluir que el tratamiento agudo con acetato de plomo produce una potenciaci3n de la actividad locomotora inducida por etanol que es estadisticamente significativa a partir del tercer d3a y que finaliza antes del noveno d3a desde la inyecci3n del metal.

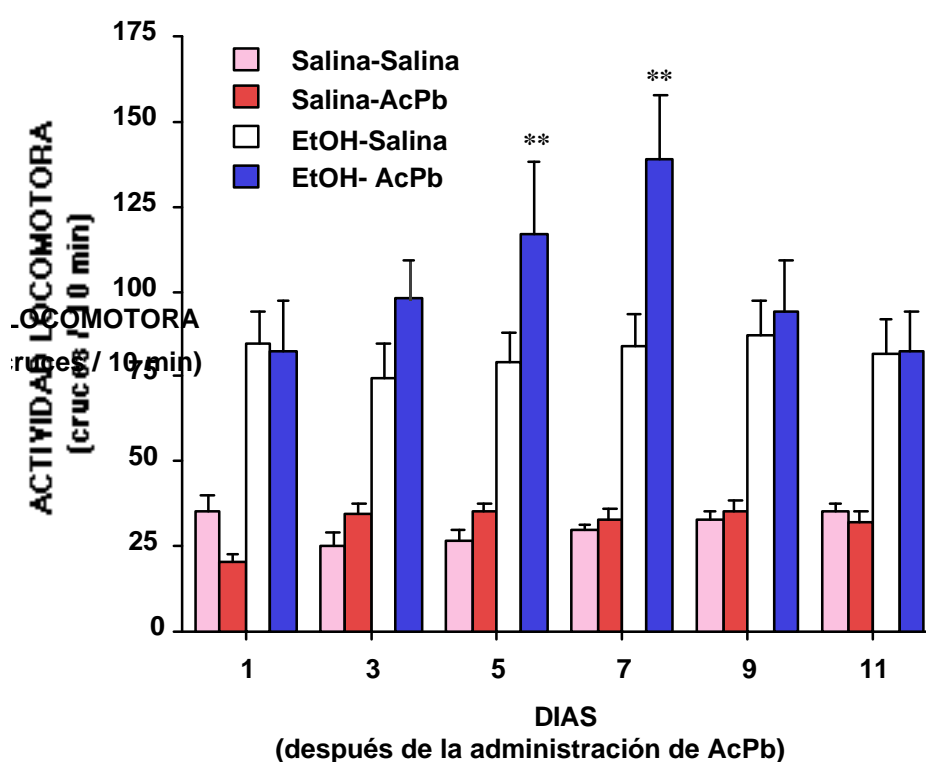


FIGURA N3 1.1.: Actividad locomotora espont3nea e inducida por etanol (2.5 g/kg, IP) en campo abierto medida a diferentes d3as (1, 3, 5, 7, 9 u 11 d3as) tras una inyecci3n aguda de acetato de plomo (100 mg/kg, IP) o soluci3n salina. Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (cruces de cuadrante realizados durante 10 minutos) ( $n=10$  por grupo). (\*\*  $p < 0.01$  significativamente diferente del grupo EtOH/salina en el mismo d3a).



## 1.2. Catalasa cerebral tras diferentes intervalos temporales.

Junto a la anterior prueba conductual, nuestro mayor interés se centró en analizar el efecto que la administración aguda de acetato de plomo ejercía sobre la actividad de la catalasa encefálica. Estos niveles fueron medidos previamente al tratamiento con plomo (100 mg/kg) (grupo control, día 0) o tras diferentes días (1, 3, 5, 7, 9 y 11) desde la administración de una única dosis de acetato de plomo. Elegimos la misma dosis de plomo que la utilizada en las pruebas conductuales. Nuestra hipótesis sugiere que el sentido del cambio en la actividad de la catalasa encefálica debería ir en la misma dirección que el observado en la actividad locomotora inducida por etanol.

TABLA 1.2.  
ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL TRAS  
UNA ADMINISTRACION AGUDA DE ACETATO DE  
PLOMO

DIA	ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / min / mg proteína)
0	0.96 ± 0.06
1	1.09 ± 0.02
3	0.89 ± 0.03
5	1.14 ± 0.13*
7	1.33 ± 0.04**
9	1.11 ± 0.04
11	0.99 ± 0.03

Media ± EMS de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) tras una inyección de acetato de plomo (100 mg/kg, IP). Los ratones fueron sacrificados previamente a la inyección (día 0) o tras 1, 3, 5, 7, 9 u 11 días después de la inyección de AcPb (n=7 por grupo). (\*\*p<0.01,\*p<0.05 significativamente diferente del día 0).

Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA cuyo único factor era el tiempo desde la administración del metal. Dicho factor resultó ser significativo (F(6,42)=5.1, p<0.01), demostrando que existe un efecto potenciador del plomo, al menos a esta dosis

y vía de administración, sobre la actividad de la catalasa medida en cerebro perfundido de ratones.

Las pruebas post hoc (LSD) demostraron que el día 5 la actividad de la catalasa era estadísticamente diferente del día 0 ( $p < 0.05$ ) y que el día 7 la actividad de la catalasa fue significativamente mayor que el resto de días ( $p < 0.01$ ). En el día 9 se observó una diferencia con un nivel de significación residual en relación al día 0 ( $p < 0.09$ ).

Es interesante resaltar que los días de máxima inducción de la catalasa son aquellos días en que la actividad locomotora inducida por una dosis de etanol también se encuentran por encima de los niveles control: los días 5 y 7 después de la administración de plomo.

### **1.3. Evolución del peso corporal tras una administración de acetato de plomo.**

Realizamos un registro de la evolución del peso corporal de animales inyectados IP con una solución salina o con una solución de acetato de plomo (100 mg/kg) durante un periodo de 25 días tras la inyección de estas soluciones. En este caso tratamos de ver si el plomo bajo este régimen de tratamiento tiene efectos deletéreos sobre el peso corporal.

Los resultados fueron estudiados mediante un ANOVA de medidas repetidas con un factor intrasujetos (días) y otro entresujetos (tratamiento con salina o con plomo). En estos datos, el factor tratamiento no fue significativo. Sin embargo, si lo fueron el factor día ( $F(12,168)=259.9$ ,  $p < 0.01$ ) y la interacción entre tratamiento y días ( $F(12,168)=6.3$ ,  $p < 0.01$ ).

El test LSD reveló que existían diferencias entre grupos de tratamiento en los días 1, 3 ( $p < 0.01$ ) y 5 ( $p < 0.05$ ). Es decir, sólo se produjo un efecto de pérdida de peso corporal en el grupo inyectado con plomo durante los 5 primeros días desde la administración del metal. En los días posteriores los animales inyectados con plomo se recuperaron hasta alcanzar los valores del grupo control.

En la figura 1.3. aparece representada la evolución del peso corporal de los dos grupos de ratones.

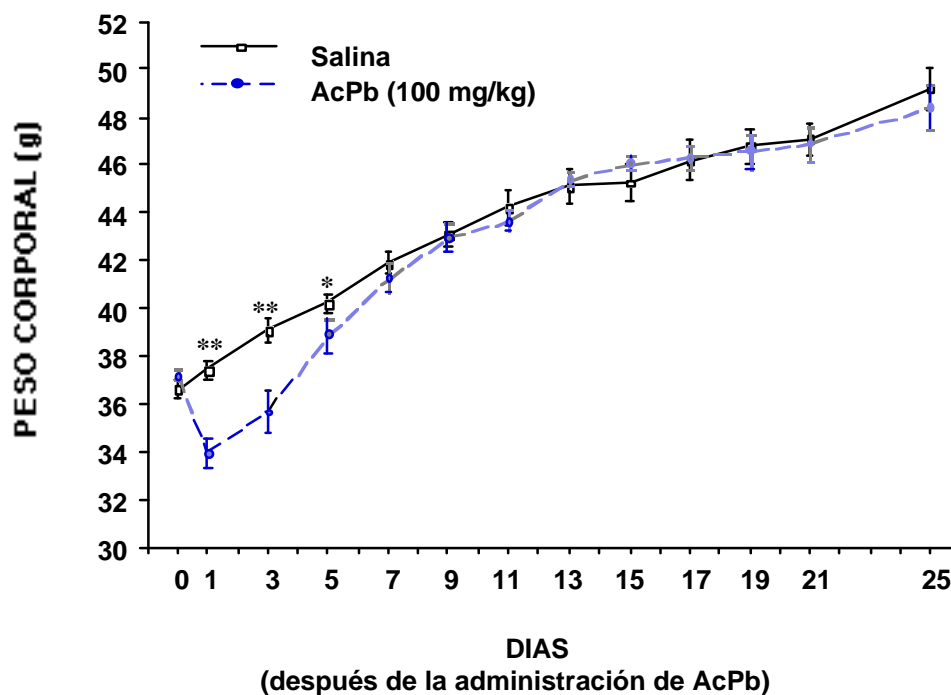


FIGURA N° 1.3.: Efecto de una administración aguda de acetato de plomo (100 mg/kg, IP) o de solución salina sobre la evolución del peso corporal de ratones. El acetato de plomo o la solución salina fueron inyectados el día 0. Media + EMS del peso corporal (gramos) para cada grupo de tratamiento en los diferentes días (n=8 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 significativamente diferente del grupo tratado con solución salina en el mismo día).

#### 1.4. Acumulación de plomo en cerebro.

En el presente estudio analizamos los niveles de plomo acumulados en tejido cerebral de ratones sometidos a un tratamiento igual al utilizado en las pruebas conductuales. Nuestro objetivo fue analizar si existía un depósito de plomo en el cerebro cuando la administración del metal era aguda y si se daba a las dosis, vía y tiempo tras la administración empleados para toda la serie de pruebas realizadas dentro de esta primera fase experimental.

Se trataba de confirmar que este régimen de exposición es efectivo en producir niveles de plomo en el cerebro mayores que los que se puedan adquirir espontáneamente del ambiente.

TABLA 1.4.

ACUMULACION DE PLOMO EN CEREBRO TRAS  
UNA ADMINISTRACION AGUDA DE ACETATO DE  
PLOMO

DIA	PLOMO EN CEREBRO ( $\mu\text{g/g}$ )
0	0.99 $\pm$ 0.24
1	3.18 $\pm$ 0.66**
3	3.91 $\pm$ 0.86**
5	3.92 $\pm$ 0.26**
7	3.22 $\pm$ 0.32**
9	3.03 $\pm$ 0.21**
11	2.26 $\pm$ 0.05*

Niveles de plomo en cerebro de ratones inyectados (100 mg/kg, IP) con acetato de plomo. Los ratones fueron sacrificados antes (día 0) o tras 1, 3, 5, 7, 9 u 11 días después de la inyección de AcPb. Media  $\pm$  EMS de los microgramos de plomo por gramo de cerebro (n=4 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 significativamente diferente del día 0).

Un análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA de un factor (día), reveló que existen un efecto significativo ( $F(6,21)=5.8$ ,  $p<0.01$ ). Las comparaciones post hoc con el test LSD, señalaron que el plomo se acumuló ya desde el primer día después de su administración. Desde el día 1 hasta el 9 las diferencias respecto al grupo control no inyectado (día 0) fueron estadísticamente significativas ( $p<0.01$ ) y para el día 11 ( $p<0.05$ ).

### 1.5. Actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.

En esta prueba analizamos la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol (0.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ó 3.5 g/kg) en animales inyectados con plomo (100 mg/kg) o con solución salina, fijando el intervalo temporal en 7 días. La elección de estas dosis de alcohol se hizo basándonos en experiencias previas de nuestro laboratorio que habían revelado que el rango de dosis entre 2-3 g/kg de etanol provocaban un incremento de la actividad locomotora, mientras que las dosis menores o mayores que

las anteriores producían una deambulaci3n igual o ligeramente inferior a la que exhiben animales no tratados con etanol.

Realizamos un ANOVA de dos factores: Tratamiento (salina / plomo) x dosis de etanol (0.0/ 1.5/ 2.0/ 2.5/ 3.0/ 3.5 g/kg). Los resultados de este an3lisis demostraron una interacci3n significativa entre el tratamiento y las dosis de etanol ( $F(5,108)=6.0$ ,  $p<0.01$ ). Asimismo se encontr3 un efecto significativo en el factor dosis de etanol ( $F(5,108)=19.5$ ,  $p<0.01$ ) lo que confirma que existen diferencias en actividad locomotora en funci3n de la dosis de etanol aplicada. No se observ3 un efecto del factor tratamiento. El hecho de no encontrar un efecto significativo de este 3ltimo factor indica que los animales ya sea tratados con plomo o con soluci3n salina responden de igual manera (bif3sica) a dosis crecientes de etanol.

Para comprobar las diferencias entre grupos individuales realizamos una prueba *post hoc* Fisher-LSD sobre la interacci3n. En primer lugar, verificamos que en el presente trabajo se reproducía el efecto bif3sico que ya habíamos encontrado en otros estudios de nuestro laboratorio. Dicho efecto predice que la actividad locomotora aumenta progresivamente a medida que lo hace la dosis aguda de etanol administrada a ratones (no a otro tipo de roedores como las ratas), hasta llegar a un punto m3ximo a partir del cual esta actividad desciende incluso llegando a niveles inferiores a la actividad locomotora espont3nea. Efectivamente se reprodujo dicho efecto bif3sico del etanol sobre la actividad locomotora. Las dosis m3s baja (1.5 g/kg) y m3s alta (3.5 g/kg) aqu3 empleadas produjeron medias de actividad mayores que la actividad espont3nea pero esta diferencia no fue significativa. Sin embargo, las tres dosis intermedias de etanol indujeron significativamente la actividad locomotora en relaci3n a la actividad espont3nea ( $p<0.01$ ).

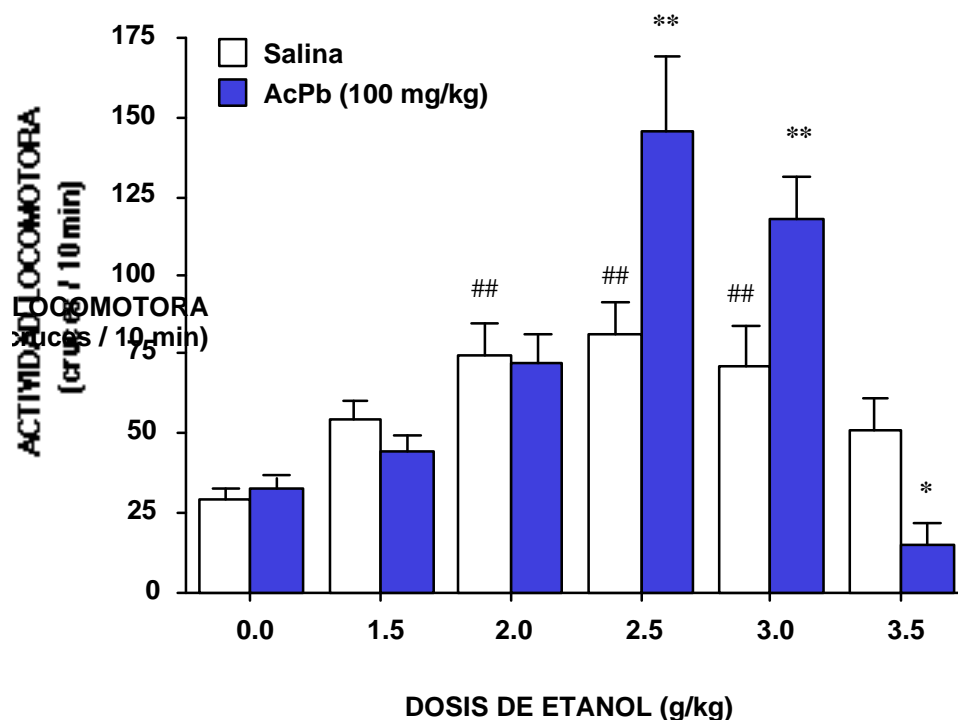


FIGURA N° 1.5. Efecto de la administración aguda de plomo sobre la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol (0.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 ó 3.5 g/kg). Siete días antes de la administración de etanol los animales fueron inyectados con acetato de plomo (100 mg/kg, IP) o salina. Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (cruces de cuadrante realizados durante 10 minutos) (n=10 por grupo). (\*\* p<0.01, \*p<0.05 significativamente diferente del grupo salina para la misma dosis de etanol) (##p<0.01 significativamente diferente del grupo salina/0.0 g/kg de etanol).

En segundo lugar, con los análisis *post hoc*, tratamos de determinar cuales eran las dosis en las cuales las diferencias entre los dos grupos eran significativas. Las dosis 2.5, 3.0 y 3.5 g/kg fueron significativamente diferentes entre el grupo pretratado con salina o con plomo (p<0.01). Los animales tratados con plomo manifestaban una mayor inducción en la actividad locomotora que los animales control ante dos dosis de etanol: 2.5 y 3.0 g/kg, dosis que, en condiciones equiparables a las control, han demostrado ejercer una mayor inducción sobre la actividad locomotora de nuestra estirpe de ratones. Sin embargo, en la dosis de 3.5 g/kg (una dosis que en los animales control es depresora) los animales inyectados con etanol mostraron una potenciación del efecto depresor de esta dosis de etanol en actividad locomotora.

### 1.6. Efectos sobre la letalidad, el peso corporal y del cerebro producidos por diferentes dosis de acetato de plomo.

En primer lugar pretendíamos comprobar si alguna de las dosis de plomo con las que íbamos a trabajar alteraba la evolución normal del **peso corporal** de los animales en este intervalo de tiempo. Para realizar esta prueba dividimos aleatoriamente a los animales en cinco grupos y comprobamos que ninguno de estos grupos era significativamente diferente de los otros antes de aplicarles el tratamiento. A continuación, inyectamos a cada grupo con una de las cinco dosis de plomo elegidas siguiendo una progresión aritmética: 0, 50, 100, 150 y 200 mg/kg. No elegimos dosis mayores dado que en roedores la dosis IP considerada LD50 es precisamente 200 mg/kg (BUDAVARI y cols., 1989).

TABLA 1.6.1.

EFECTO DE LA ADMINISTRACION AGUDA DE  
ACETATO DE PLOMO SOBRE EL PESO CORPORAL

DOSIS de AcPb (mg/kg)	PESO CORPORAL (g)
0	37.70 ± 0.76
50	38.48 ± 0.51
100	36.30 ± 0.93
150	33.42 ± 0.68**
200	31.56 ± 1.10**

Media ± EMS del peso corporal de animales inyectados (IP) con una dosis de acetato de plomo (0, 50, 100, 150 or 200 mg/kg). Los animales fueron inyectados con plomo 7 días antes del registro del peso (n=10 por grupo). (\*\* p<0.01 significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AcPb).

Los animales, después de la administración de plomo permanecieron alojados en las condiciones normales de nuestro estabulario durante un periodo de siete días. El séptimo día todos los animales fueron pesados individualmente teniendo en cuenta el

grupo al cual pertenecían. Los datos fueron analizados realizando un ANOVA de un factor con cinco niveles. El factor dosis de plomo resultó tener un efecto sobre la variable dependiente, ( $F(4,48)=13.6$ ,  $p<0.01$ ).

Realizamos una prueba LSD para comprobar las diferencias entre las medias. Sólo las dosis de 150 y 200 mg/kg resultaron ser significativamente diferentes del resto de grupos ( $p<0.01$ ). Así pues, confirmamos que el efecto tóxico del plomo sobre la evolución del peso corporal de los ratones aumentaba cuando lo hacía la dosis.

En cuanto a la **letalidad** se realizó un registro paralelo de los animales que durante la semana de espera para el anterior registro del peso, morían presumiblemente por el efecto del metal. En esta prueba encontramos que la dosis más alta de plomo (200 mg/kg) resultaba letal para el 30% de nuestros animales. En ninguna de las restantes dosis el plomo ejerció un efecto letal, al menos en el intervalo de tiempo registrado (7 días).

Uno de los parámetros que también nos sirvió de control sobre la toxicidad de las diferentes dosis de acetato de plomo fue el **peso total del cerebro húmedo**. Los animales eran inyectados con la correspondiente dosis de acetato de plomo (0, 50, 100 ó 150 mg/kg) y a los siete días de la inyección eran sacrificados y el cerebro era extraído tras ser perfundido. Estos datos aparecen en la tabla 1.6.2.

Un ANOVA donde el factor principal era la dosis de acetato de plomo administrada, reveló que no existía un efecto significativo de la dosis sobre esta variable. Sin embargo, una observación de los datos indica un ligero descenso del peso del cerebro en todos los grupos inyectados con plomo. Realizamos una prueba *post hoc* que nos aportase más información sobre las diferencias entre cada grupo y pudimos comprobar que la dosis mayor de acetato de plomo (150 mg/kg) afectaba significativamente al peso del cerebro tras 7 días desde su administración comparado con el grupo control inyectado con un volumen equivalente de solución salina ( $p<0.05$ ). Este último dato no es extraño si tenemos en cuenta que la dosis de 150 mg/kg también resultó afectar al peso total de los ratones. Quizá en estos animales se produzcan alteraciones en la ingesta de alimentos que lleven a un estado de desnutrición y éste afecte a los dos parámetros mencionados: peso total del sujeto y peso total del cerebro.



TABLA 1. 6. 2.

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE  
ACETATO DE PLOMO SOBRE EL PESO DEL  
CEREBRO

DOSIS DE AcPb (mg/kg)	PESO CEREBRAL (mg)
0	474.6 ± 4.9
50	455.4 ± 11.9
100	460.5 ± 6.5
150	449.3 ± 8.6*

Media ± EMS del peso del cerebro humedo 7 días después de una inyección de acetato de plomo (0, 50, 100 ó 150 mg/kg, IP) (n=13 por grupo). (\*p<0.05 significativamente diferente de la dosis 0 mg/kg de AcPb).

### 1.7. Efecto de diferentes dosis de plomo en actividad locomotora.

A partir de los datos de la toxicidad del plomo sobre una variable fisiológica como el peso, decidimos eliminar la dosis más alta de plomo (200 mg/kg) del rango de dosis a utilizar en conducta, dado que ésta era la única que había demostrado producir un letalidad significativa sobre los ratones.

De hecho, los sujetos empleados en la presente prueba fueron los mismos que los utilizados en el anterior experimento para el registro del peso corporal. Una vez registrado el peso, el animal era inyectado con la dosis de etanol o de salina correspondiente y comenzaba el registro de la actividad locomotora en campo abierto. Pretendíamos observar cual era el intervalo de dosis de plomo que interaccionaba con el alcohol sin afectar a la actividad locomotora espontánea.

Continuamos trabajando con el intervalo temporal de siete días tras la administración IP de plomo. El protocolo experimental fue el mismo que se utilizó en los experimentos anteriores. Las dosis de etanol empleadas fueron: 0.0 y 2.5 g/kg. Las dosis de plomo utilizadas fueron: 0, 50, 100 y 150 mg/kg. La figura N° 1.7. representa dicho efecto.

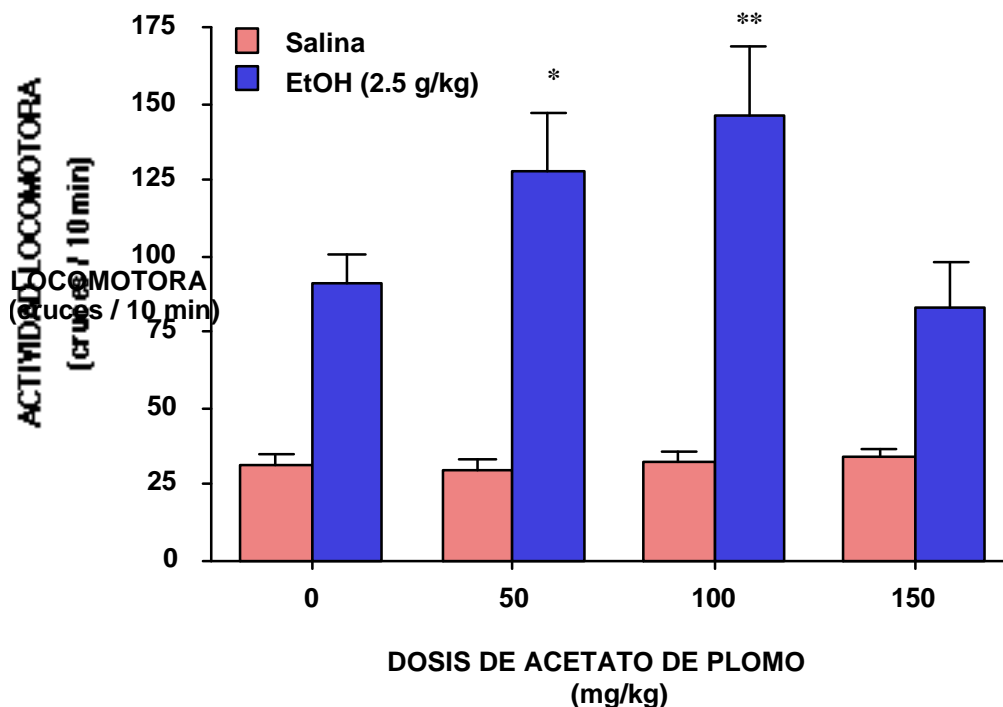


FIGURA N° 1.7. Efecto de diferentes dosis de acetato de plomo (0, 50, 100 ó 150 mg/kg) sobre la actividad locomotora espontánea (salina) o inducida por etanol (2.5 g/kg). El acetato de plomo fue administrado (IP) 7 días antes de la inyección de etanol (2.5 g/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (cruces de cuadrante realizados durante 10 minutos) (n=10 por grupo). (\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AcPb/ EtOH). En el caso de los grupos inyectados con 0.0 g/kg de etanol (solución salina) y diferentes dosis de plomo, ninguno de ellos resultó significativamente diferente de los demás. Así pues, un incremento en la dosis de plomo, hasta un máximo de 150 mg/kg, no producía diferencias significativas en la actividad locomotora espontánea de los animales.

Para el análisis de los datos, efectuamos un ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0/ 50/ 100 / 150 mg/kg) x dosis de etanol (0.0 / 2.5 g/kg). Encontramos que existía un efecto tanto de los dos factores como de la interacción ( $F(3,72)=2.9$ ,  $p < 0.05$ ). La significación en el el factor dosis de etanol ( $F(1,72)=84.0$ ,  $p < 0.01$ ), estaba indicando que en general en todas las dosis de plomo los efectos del etanol son diferentes a los efectos de la solución salina. Es decir, el etanol indujo la actividad locomotora. El factor dosis de plomo resultó también ser significativo ( $F(3,72)=2.8$ ,  $p < 0.05$ ), lo que apuntaba a que ciertas dosis de plomo producían un incremento de la actividad locomotora inducida por etanol en relación a los animales que habían recibido la dosis 0 mg/kg de plomo.

Para comprobar entre qué dosis existían diferencias realizamos una prueba Fisher-LSD y resultó que los grupos de 50 y 100 mg/kg de plomo-2.5 g/kg de etanol eran estadísticamente diferentes del grupo 0 mg/kg de plomo-2.5 g/kg de etanol ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) así como del 150 mg/kg de plomo-2.5 g/kg de etanol ( $p < 0.01$ ), sin embargo, esta última dosis de plomo no fue diferente del control. En cuanto a las dosis de plomo de 50 y de 100 mg/kg no encontramos diferencias significativas entre ellas.

Estos datos parecían indicar que la interacción encontrada entre el tratamiento con plomo y el etanol, era dependiente de la dosis del metal empleada. Más concretamente sugería que la dosis de 50 mg/kg era una dosis que producía efectos equivalentes a la dosis de 100 mg/kg. En cuanto a la dosis de 150 mg/kg no tuvo el mismo efecto potenciador que las otras dos dosis.

### **1.8. Actividad de la catalasa encefálica ante diferentes dosis de plomo.**

Una vez observado el efecto de las diferentes dosis de plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol, nuestro mayor interés se centró en analizar el efecto que la administración aguda de diferentes dosis de acetato de plomo tiene sobre la actividad de la catalasa encefálica. Elegimos las mismas dosis de plomo que las utilizadas en las pruebas conductuales y el mismo intervalo temporal entre la administración del plomo y el registro de la variable dependiente. Los niveles de actividad catalítica de la catalasa de los diferentes grupos de tratamiento se presentan en la tabla 1.8.

Tal y como puede observarse, la administración de las diferentes dosis de plomo produjo un incremento de dicha actividad del 32% en el caso de la dosis de 50 mg/kg y de 45% para la dosis de 100 mg/kg de plomo en relación a la dosis 0 mg/kg. Este hecho fue corroborado mediante un nuevo ANOVA, unifactorial para el factor dosis de plomo. Los resultados indicaron un efecto significativo de dicho factor ( $F(3,36)=17.5$ ,  $p < 0.01$ ).

En los contrastes de medias efectuados (LSD Fisher) se constató la existencia de diferencias significativas, entre la actividad de la catalasa inducida por la dosis 0 mg/kg y las dosis 50 y 100 mg/kg de plomo ( $p < 0.01$ ). A su vez, estas dos dosis no fueron significativamente diferentes entre sí. La dosis más alta de plomo (150 mg/kg) no fue significativamente diferente de la dosis control.

TABLA 1.8.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL TRAS  
UNA ADMINISTRACION AGUDA DE DIFERENTES  
DOSIS DE ACETATO DE PLOMO

DOSIS DE AcPb (mg/kg)	ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / min / mg proteína)
0	0.92 ± 0.05
50	1.24 ± 0.02**
100	1.34 ± 0.03**
150	0.87 ± 0.08

Media ± EMS de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) 7 días después de una inyección de diferentes dosis de acetato de plomo (0, 50, 100 ó 150 mg/kg, IP) (n=10 por grupo). (\*\*p<0.01 significativamente diferente de la dosis 0 mg/kg de AcPb).

### 1.9. Niveles de etanol en plasma.

Realizamos un control de los niveles de etanol en el plasma sanguíneo alcanzados por animales inyectados con plomo comparándolos con los niveles de animales inyectados con solución salina. Las mediciones se realizaron 15, 30 ó 60 minutos después de la inyección de etanol. Elegimos la dosis de etanol que más actividad locomotora había inducido (2.5 g/kg). Por la misma razón, en el caso de la latencia entre la administración de plomo y la administración de etanol, utilizamos el intervalo temporal de 7 días.

Verificamos que la interacción entre la administración de plomo y la administración de etanol no se producía a niveles periféricos, es decir que el plomo en las dosis que habían producido potenciación (50 y 100 mg/kg) no estaba interfiriendo con la farmacocinética del etanol.

TABLA 1.9.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION AGUDA DE DIFERENTES DOSIS DE ACETATO DE PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE ETANOL EN SANGRE (mg/dl)

TIEMPO (minutos)	DOSIS DE AcPb (mg/kg)		
	0	50	100
15	269.8 ± 6.3	286.7 ± 14.1	265.5 ± 18.9
30	242.5 ± 4.8	241.2 ± 6.0	244.1 ± 11.8
60	183.0 ± 12.3	182.6 ± 7.2	175.1 ± 5.9

Media ± EMS de etanol en plasma (mg/dl) tras una administración aguda IP de 2.5 g/kg de etanol en animales a los cuales 7 se les inyectó acetato de plomo (0, 50 ó 100 mg/kg, IP). La sangre troncal fue recogida 15, 30 ó 60 minutos después de la administración de etanol (n=4 por grupo).

Analizamos los datos mediante un análisis de varianza de dos factores: Tiempo (15/ 30/ 60 minutos) x dosis de plomo (0 / 50 / 100 mg/kg). El factor tiempo resultó ser significativo ( $F(2,27)=59.0$ ,  $p<0.01$ ), lo que indicaba que el etanol a medida que pasaban los minutos iba desapareciendo del plasma en todos los grupos. Sin embargo, no lo fueron el factor dosis de plomo ni tampoco la interacción entre la dosis y el tiempo.

La comparación *post hoc* LSD reveló que el plomo no estaba afectando los niveles de etanol en sangre en ninguno de los intervalos estudiados en relación al grupo inyectado con solución salina ya que ninguno de los grupos dentro del mismo intervalo temporal fue diferente de los otros dos.

### **1.10. Correlación entre actividad de la catalasa encefálica y actividad locomotora inducida por etanol en animales tratados con plomo de manera aguda.**

Finalmente, se realizó un estudio correlacional entre dos de las variables dependientes utilizadas: una conductual y la otra bioquímica. Se tomó por un lado, las medias de la actividad locomotora inducida por etanol de los diferentes grupos de tratamiento con plomo (diferentes días y dosis) y por otro, las medidas de la actividad de la catalasa cerebral para esos mismos grupos de tratamiento, pero pertenecientes a sujetos experimentales diferentes. Con esta correlación queríamos observar en qué medida ambas variables (actividad locomotora inducida por etanol / nivel de actividad de la catalasa encefálica) podían estar relacionadas.

La covariación de ambas medidas se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson que dio un valor  $r=0.873$ , mostrando que la relación entre ambas era estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ).

En la figura N° 1.10. aparece la línea de regresión obtenida, así como los valores medios en las dos variables para cada grupo.

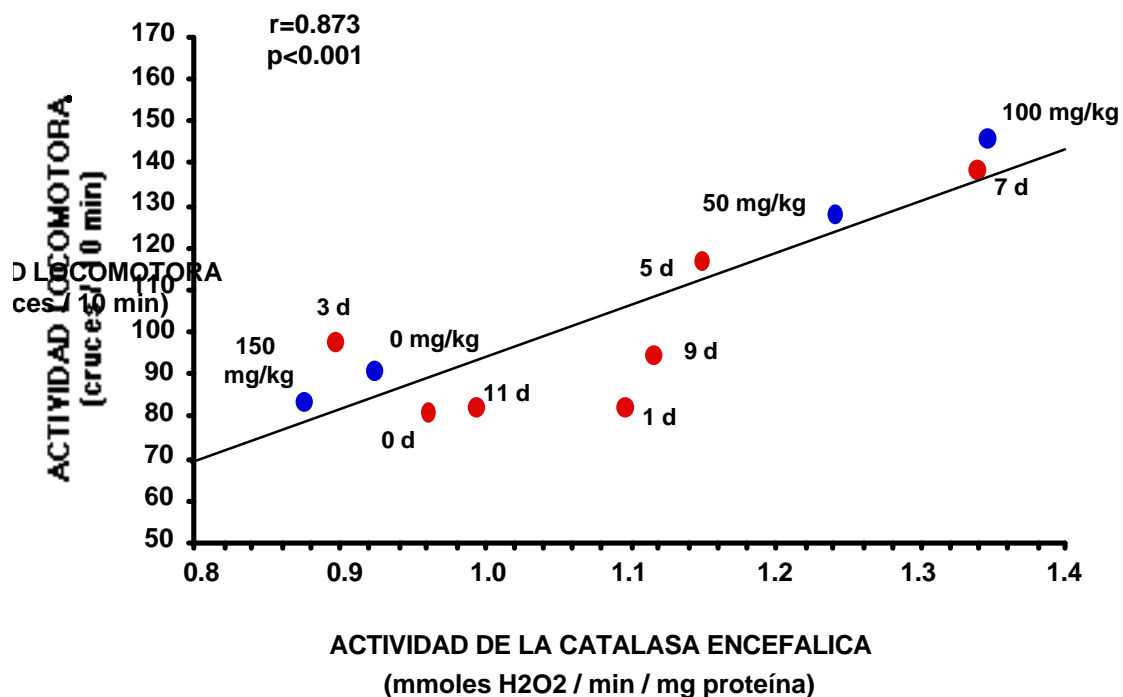


FIGURA N° 1.10.: Relación entre la actividad de la catalasa cerebral en un grupo de ratones tratados con acetato de plomo y la actividad locomotora inducida por etanol en otro grupo de ratones con el mismo tratamiento. El acetato de plomo (0, 50, 100 ó 150 mg/kg, IP) fue inyectado 0, 1, 3, 5, 7, 9 u 11 días antes de la administración aguda de etanol (0 ó 2.5 g/kg, IP) o la extracción del cerebro para la medición de la actividad de la catalasa. Datos de la fase I.

## **Discusión de los resultados.**

A partir de los resultados conseguidos en la presente fase, la principal conclusión que se obtuvo fue que el acetato de plomo administrado de manera aguda potenciaba la actividad locomotora inducida por etanol, así como los niveles de actividad de la catalasa cerebral. En ambos casos, esos efectos se daban especialmente cuando la latencia entre tratamientos alcanzó los 7 días.

En el caso de la actividad locomotora inducida por etanol, las diferencias entre ambos grupos (tratados con salina o con plomo) aparecieron desde el quinto día de la administración del tratamiento y aumentaban hasta alcanzar la máxima diferencia al séptimo día, volviendo a partir del día noveno a valores control. La actividad locomotora inducida por etanol experimentó un aumento del 55% el día 5 y del 70% el día 7 en relación a sus respectivos controles.

En cuanto a los resultados obtenidos en la actividad de la enzima cerebral catalasa observamos que la potenciación de dicha actividad aparecía del día 5 al día 7 después de la administración de plomo, volviendo luego a la actividad de los valores control. Los porcentajes de inducción de la catalasa fueron del 20% en el caso del día 5 y del 40% el día 7, ambos en relación al control. Estos resultados confirman datos previos (VALENZUELA y cols., 1989; SOMASHEKARAI AH y cols., 1992; De GENNARO, 1987) que han demostrado una potenciación de la actividad de la catalasa encefálica tras una administración aguda de plomo. En estos estudios, la actividad de la catalasa se incrementa progresivamente con el tiempo después de la administración de plomo (VALENZUELA y cols., 1989; SOMASHEKARAI AH y cols., 1992), al igual que sucedió en el presente trabajo.

Se puede apreciar la existencia de un paralelismo entre actividad locomotora inducida por etanol y actividad catalítica de la catalasa en relación a la temporalidad desde la administración de plomo y la correspondiente medición de la actividad en ambas variables. Junto a esto, al relacionar ambas variables, apareció un alto nivel de correlación.

Asimismo, hemos observado que la interacción plomo-deambulacion inducida por etanol ocurre en más de una dosis de etanol. Las diferencias entre los grupos control y los grupos de animales inyectados con plomo se manifestó en las dosis más altas de etanol. Dos de las dosis (2.5 y 3.0 g/kg) produjeron una inducción de la actividad locomotora mayor en los animales tratados con plomo en relación a las mismas dosis de



etanol en los animales control. En concreto, la potenciación de la inducción fue del 70% en la dosis de 2.5 g/kg y de 65% en la dosis de 3.0 g/kg. Sin embargo, con dosis mayores de etanol (3.5 g/kg) aquellos animales tratados con plomo mostraron una mayor depresión de la actividad locomotora que los animales control. También se pudo corroborar, en el estudio de las dosis de etanol, que se reproduce la conocida acción bifásica del etanol sobre la actividad locomotora en ratones. Hasta la dosis de 2.5 g/kg de etanol, administrados a la estirpe de ratones Swiss, se produjo un incremento creciente de la deambulación en relación al control que recibió solución salina. A partir de ésta, dosis mayores produjeron una menor deambulación, que llegó a ser estadísticamente no diferente del control. Este efecto bifásico de las dosis de etanol, apareció tanto en los animales inyectados con plomo como en los animales control.

Los resultados del estudio de dosis de plomo, hacen posible predecir que dentro de un rango entre 0 y 100 mg/kg de acetato de plomo podrá encontrarse dicha interacción potenciadora, ya que la dosis de 50 mg/kg también produce un aumento de la inducción producida por el etanol. En cuanto a la actividad de la catalasa cerebral, ésta también aumenta dentro del mismo rango de dosis. Sin embargo, los resultados hallados en la dosis de 150 mg/kg parecen responder a un efecto bifásico del plomo: altas dosis de plomo producen una respuesta locomotora inducida por el etanol y una actividad de la catalasa encefálica que se sitúa en valores parecidos a los grupos control. Desconocemos cual es el posible mecanismo de la respuesta bifásica del plomo en interacción con el etanol. El hecho de que no se viera afectada la actividad locomotora espontánea en los animales inyectados con la dosis de plomo más alta (150 mg/kg), nos hizo desestimar la hipótesis de que se tratara de un deterioro motor en general.

Por otro lado, es importante destacar que en todas las dosis de plomo nuevamente se produjo un paralelismo entre actividad de la catalasa y deambulación inducida por etanol, ya fuera en las dosis de plomo que producían potenciación (50 y 100 mg/kg) como en aquellas que no modificaron la actividad locomotora inducida por etanol (150 mg/kg) en relación al grupo control (0 mg/kg).

Estos resultados en conjunto son acordes con datos previos que demuestran que las manipulaciones de la catalasa cerebral se traducen consistentemente en alteraciones de las conductas inducidas por etanol (ARAGON y cols., 1985; 1989; 1992; TAMPIER y cols., 1988; ARAGON y AMIT, 1993). En este sentido, encontramos la reducción de la actividad locomotora inducida por etanol observada en ratones pretratados con AT, así como en ratones acatalasémicos (ARAGON y AMIT, 1993). En estos estudios los ratones con niveles de catalasa genética o farmacológicamente reducidos también

disminuyeron su actividad locomotora inducida por etanol. Por otro lado, como se observa en el presente trabajo, cuando la actividad de la catalasa cerebral fue potenciada en ratones, también lo fue la actividad locomotora inducida por etanol en relación a los controles. Sin embargo, y a partir de los datos de la correlación, dado que la actividad de la catalasa no explicó el 100% de la varianza es necesario señalar que otras variables pueden participar en el resultado conductual finalmente observado.

En el presente estudio se trató de controlar algunos parámetros indicadores de la plumbemia inducida en estos animales con el fin de minimizar los efectos fisiológicos, bioquímicos y conductuales perniciosos sobre las variables dependientes relevantes para nosotros: actividad locomotora inducida por etanol y actividad de la catalasa encefálica. En primer lugar, en un estudio piloto, pudimos observar que la dosis de plomo de 100 mg/kg deteriora la actividad locomotora espontánea de los animales en campo abierto durante un periodo de tiempo incluido en la primeras 12 horas. En el primer estudio de la presente fase experimental sólo aparece una ligera disminución de la actividad locomotora espontánea de los animales tratados con plomo en relación a los controles el primer día, pero esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. Pasadas las primeras 24 horas esta conducta permaneció en niveles control al menos hasta 11 días después de la administración de plomo. Es decir el efecto atáxico (GOYER, 1993) sólo se manifestó en nuestra estirpe de ratones durante las primeras horas de la intoxicación aguda. Tampoco hemos podido observar el efecto contrario: hiperactividad inducida por intoxicación con plomo (SAUERHOFF y MICHAELSON, 1973), ya que como hemos dicho antes la deambulación no aumentó con el tiempo. Este resultado está acorde con datos de otros trabajos (DONOVICK y BURRIGHT, 1986) que no encuentran efectos del plomo en actividad motora cuando los animales que han sufrido la intoxicación por plomo son animales adultos como los nuestros, aunque sí que se da en animales recién nacidos o en animales muy jóvenes (DAVID y cols., 1972; SAUERHOFF y MICHAELSON, 1973).

En relación a otras variables observadas como control de los efectos deletéreos del plomo, éste también ejerció una influencia transitoria. En el caso de la evolución del peso corporal, los animales tratados con el metal perdieron peso en relación al control desde el primer día y la evolución de su peso continuó siendo diferente hasta 5 días después. Sin embargo, a los siete días cuando los efectos de interacción entre el etanol y el plomo fueron mayores, el peso de los animales ya estaba totalmente recuperado y continuó así, al menos hasta los 25 días después de la administración. Por lo que respecta al efecto letal del plomo, la dosis letal referida en la literatura como LD50

(BUDAVARI y cols., 1989) para el acetato de plomo IP en ratones era 200 mg/kg, sin embargo, en nuestra estirpe (Swiss) pudimos comprobar que la letalidad sólo alcanzó un 30%. Esto, junto a otros indicadores, hace pensar que se trata de una estirpe resistente a los efectos nocivos del plomo, ya que la dosis de 100 mg/kg no afectó ni a la deambulaci3n, ni al peso del animal, ni al de su cerebro. A pesar de esta aparente resistencia a los efectos nocivos del plomo, no se puede excluir la posibilidad de que los resultados obtenidos en deambulaci3n inducida por etanol a la dosis de plomo de 150 mg/kg no fueran una influencia de la toxicidad producida por dicha dosis, ya que el peso de los animales disminuy3, aunque no ocurriera lo mismo con la actividad locomotora espontánea.

Por otro lado, para descartar la posibilidad de que el efecto del plomo se ejerza afectando la absorci3n o el metabolismo periférico del etanol, fueron realizadas una serie de pruebas como la evaluaci3n de los niveles de etanol en plasma y la medici3n de la acumulaci3n de plomo en tejido cerebral. En estos resultados, la vía y la dosis utilizadas resultaron eficaces al producir niveles incrementados de plomo en cerebro. Esto indica que el efecto que el metal est3 ejerciendo sobre la catalasa cerebral puede hacerlo directamente en este tejido ya que desde el primer día se encuentran niveles elevados de plomo. Una observaci3n de las medias muestra que a partir del quinto día (en el cual se produce la máxima acumulaci3n) el nivel de plomo va disminuyendo, aunque sería necesario un seguimiento más prolongado para poder observar si se vuelve a niveles normales de plomo detectado en cerebro. Por los datos que aparecen en estudios con humanos se puede apreciar que un cierto nivel de plomo que llegue a tejido cerebral ocasiona una presencia mantenida del metal en este tejido durante mucho tiempo (meses e incluso años) (BARRY, 1975).

La evaluaci3n de los niveles de etanol en sangre aportó pruebas de que el plomo no estaba interfiriendo con procesos de absorci3n o de metabolismo periférico del etanol. Estos niveles tras una administraci3n aguda de etanol igual a las utilizadas en los experimentos conductuales, no se diferenciaron entre los tres grupos de tratamiento en ninguno de los momentos evaluados, por lo que se puede excluir la posibilidad de que la interacci3n etanol-plomo, a las dosis en las que se manifiesta la potenciación, se diera a nivel periférico. Esto adquiere una importancia crucial si tenemos en cuenta que el intervalo de tiempo evaluado (de 15 a 60 minutos tras la administraci3n del etanol) incluye el utilizado para evaluar la actividad locomotora (medida del minuto 10 al 20 desde la administraci3n de etanol). Este resultado est3 en la línea de los obtenidos en las manipulaciones del inhibidor de la catalasa AT, que no parece modificar los niveles

plasmáticos de dosis de etanol como las evaluadas en el presente estudio (ARAGON y cols., 1985a; 1989). Por ello, todos estos datos sugieren que la catalasa periférica (hepática, sanguínea, etc.) no es un factor crucial en los procesos de metabolismo del etanol, aunque en realidad a los tiempos en que se realizaron las mediciones de los niveles de etanol (hasta 60 minutos después de la administración), predominan los procesos de absorción más que los periféricos.

Resumiendo, se ha podido demostrar que el plomo a diferentes dosis e intervalos temporales y administrado de manera aguda potencia la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol, así como la catalasa cerebral y todo ello sin alterar los niveles plasmáticos de etanol.

***FASE EXPERIMENTAL II.***

***ESPECIFICIDAD DE 10L EFECTO DE UNA  
ADMINISTRACION AGUDA DE ACETATO  
DE PLOMO SOBRE LA ACTIVIDAD  
LOCOMOTORA INDUCIDA POR ETANOL.***

## **Introducción.**

Dados los resultados obtenidos en la primera fase experimental donde el acetato de plomo demostró potenciar la actividad locomotora inducida por etanol, así como la actividad de la catalasa encefálica, en esta segunda fase de experimentos comprobamos, de una manera indirecta, que la acción potenciadora del plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol se debe a una acción específica sobre el mecanismo metabólico de esta droga. Tratamos de observar que la potenciación de la actividad locomotora inducida, no aparecía cuando se administraron otras drogas inductoras de la deambulación, excluyendo con ello explicaciones alternativas a la potenciación de la catalasa.

En algunos de los trabajos revisados (LESLEY y cols., 1984; POKORA y cols., 1996) hemos encontrado un vínculo entre la administración de este metal y modificaciones en circuitos neurales dopaminérgicos, circuitos tradicionalmente implicados en la conducta motora espontánea o inducida por ciertas drogas. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición crónica a plomo produce un decremento de la disponibilidad de dopamina en el núcleo accumbens (POKORA y cols., 1996). Por otro lado la administración aguda de etanol incrementa los niveles extracelulares de dopamina en el mismo núcleo (IMPERATO y Di CHIARA, 1986; YOSHIMOTO y cols., 1992). Por lo tanto, la vía mesolímbica ha sido propuesta como un posible emplazamiento para la interacción del plomo y las conductas inducidas por etanol. Esta última hipótesis ha sido ampliamente utilizada por autores que administran ambas sustancias (plomo y etanol) de manera crónica a ratas y observan cambios en ciertas variables bioquímicas (FLORA y TANDOM, 1987) o conductuales (NATION y cols., 1993).

En nuestro trabajo la vía y modo de administración del metal difieren notablemente de las utilizadas en los trabajos anteriores. Pocos son los precedentes bibliográficos que administran plomo de manera aguda conjuntamente con etanol y observan los resultados en conducta (SWARTZWELDER, 1984), pero ninguno de ellos lo hacen en interacción con otras drogas psicoestimulantes. Sin embargo, hemos podido encontrar referentes de administración crónica de plomo en interacción con drogas como *d*-anfetamina, cocaína y etanol (ZENICK y GOLDSMITH, 1981; RAFALES y

cols., 1979; FLORA y TANDOM, 1987; GROVER y cols., 1993a; NATION y cols., 1993). En el caso del etanol la interacción produce un efecto antagónico en un amplio rango de conductas inducidas por etanol en ratas (hipoalgesia, efectos antipunitivos, depresores, etc) (NATION y cols., 1991b; GROVER y cols., 1993b; BURKEY y NATION, 1994).

El estudio de la *d*-anfetamina en interacción con este metal ha sido considerado de especial interés por su vertiente más aplicada. Por un lado, una de las alteraciones que parece producir el plomo es el deterioro motor, tanto por defecto (ataxia o parestesia) como por exceso (hiperactividad) (SILBERGELD y GOLDBERG, 1974; GOLTER y MICHAELSON, 1975; BORNSCHEIN y cols., 1980). La *d*-anfetamina ha demostrado tener un uso terapéutico en algunas formas de hiperactividad infantil (PAROD y DOLGIN, 1993), por lo tanto, dentro de los trabajos que se centran en estudiar esta alteración conductual, el tratamiento con plomo (tratamiento crónico prenatal o en edad temprana) es un buen modelo de hiperactividad en animales. En general, en los mencionados estudios (RAFALES y cols., 1979; ZENICK y GOLDSMITH, 1981; GROVER y cols., 1993a), tanto en interacción con la *d*-anfetamina como con la cocaína, el plomo administrado de manera crónica demostró antagonizar los efectos inductores de estas drogas sobre la actividad locomotora de ratas (RAFALES y cols., 1979) y aumentó los umbrales de discriminación de las mismas (ZENICK y GOLDSMITH, 1981).

Por lo tanto, las interacciones observadas entre plomo y drogas como *d*-anfetamina, cocaína y etanol se traducen en un antagonismo conductual que ocasiona una disminución del efecto esperado en aquellos animales a los que sólo se les administra la droga (RAFALES y cols., 1979; GROVER y cols., 1993a).

Por otro lado, también existen pruebas de la especificidad de ciertos inhibidores de la catalasa sobre las acciones conductuales del etanol. Encontramos numerosas pruebas de que el efecto inhibitor sobre la catalasa producido por el AT es específico para los efectos del etanol. Así pues ha sido demostrado que el AT no atenúa los efectos conductuales inducidos por drogas como la morfina, el fenobarbital o el cloruro de litio (QUINTANILLA y cols., 1980; ARAGON y cols., 1985a). Es más, en los estudios con ratones mutantes acatalasémicos se han podido observar diferencias en la actividad locomotora inducida por etanol entre los mutantes y los ratones normales de la misma estirpe, pero estas diferencias desaparecen cuando la droga administrada es cocaína (ARAGON y AMIT, 1993).

En nuestro trabajo hemos elegido observar la especificidad del efecto potenciador del plomo (administrado de manera aguda) sobre la actividad locomotora inducida por etanol a través de su acción sobre la catalasa cerebral utilizando como drogas inductoras de la deambulación *d*-anfetamina y otros dos alcoholes: t-butanol y metanol. Las tres drogas han demostrado (DUDEK y PHILLIPS, 1983) inducir esta conducta bajo parámetros experimentales similares a los utilizados por nosotros a lo largo del presente estudio. La *d*-anfetamina es una droga que no comparte las vías metabólicas encefálicas con el etanol, es más, la molécula de *d*-anfetamina no necesita ser transformada para ejercer su acción psicoestimulante (PAROD y DOLGIN, 1993). Por lo que se refiere a los dos alcoholes, poco es conocido acerca del metabolismo del t-butanol (butil alcohol terciario, TBA) pero sí sabemos que es un alcohol con una cadena ramificada que no se transforma en un aldehído y no es metabolizado por la catalasa (POET y cols., 1997). En el caso del metanol la situación es la opuesta; es ampliamente aceptado que en roedores el metanol es un sustrato selectivo para la catalasa hepática (BRADFORD y cols., 1993) y que etanol y metanol compiten por este sistema enzimático (TAMPIER y cols., 1980). El metanol se transforma en formaldehído, principal responsable de los efectos tóxicos de este alcohol (BRADFORD y cols., 1993).

A partir de lo anterior, las hipótesis de partida que nos planteamos en esta fase experimental fueron las siguientes:

1.- Esperábamos corroborar que las cuatro drogas empleadas: etanol, *d*-anfetamina, t-butanol y metanol ejercieran una inducción de la actividad locomotora de los ratones.

2.- El tratamiento agudo con acetato de plomo debía ejercer un efecto potenciador de la actividad locomotora inducida por una dosis aguda de etanol. Dado que en esta fase experimental realizamos una cuantificación diferente (centímetros en lugar de cruces) para la misma variable (actividad locomotora), consideramos necesario repetir el efecto encontrado del plomo en interacción con el etanol. Esto era necesario, por un lado, para cerciorarnos una vez más del efecto y comprobar que éste aparecía incluso con una forma de registrar la actividad diferente, pero principalmente porque se trataba del experimento con el que se compararon el resto de drogas probadas en el presente apartado.

3.- En el caso de *d*-anfetamina no esperábamos que apareciese ningún efecto dado que partíamos de la hipótesis de que la interacción plomo/etanol en conducta está mediada por la intervención de la catalasa como mecanismo de metabolismo de etanol



y que la catalasa no tiene ningún papel, no el menos conocido, en el metabolismo de la anfetamina ni siquiera podemos pensar que éste sea necesario para que la droga ejerza su efecto.

4.- En el caso de los otros dos alcoholes, carecíamos de datos que nos permitiesen predecir qué iba a ocurrir con el t-butanol, pero esperábamos que, dado que su metabolismo no precisa de la actividad de la catalasa, no se produciría ningún cambio en la deambulaci3n inducida en relaci3n a los controles.

5.- En lo referente al metanol, dado que el tratamiento con plomo deba ejercer un efecto inductor sobre la catalasa y, en caso de que el metabolito primero del metanol (formaldehido) ejerciese alg3n papel sobre la actividad locomotora, observaríamos alg3n cambio en dicha conducta.

## **Materiales y métodos.**

### **I. Estudios Conductuales.**

**Sujetos y Condiciones de alojamiento.** Los sujetos y condiciones generales en las que se desarrolló tanto el alojamiento como las pruebas conductuales son análogos a las de la fase precedente.

**Drogas.** Las sustancias empleadas en los tratamientos aplicados a los sujetos experimentales fueron administradas de manera aguda con una inyección intraperitoneal (IP). Son las siguientes:

- Acetato de Plomo. (Panreac Química S.L.). Se preparó una solución de acetato de plomo disuelto en agua destilada a una concentración de 0.5 mg/ 10 ml.

- Solución Salina. Se preparó una solución de cloruro sódico (Panreac Química S.A.) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.9%.

- Etanol. Se preparó una solución de alcohol etílico de 96° (Panreac Química S.A.) al 20% v/v (21 ml en 100 ml de agua destilada).

- *d*-anfetamina. (Sigma Aldrich, S.A.). Preparamos una solución con *d*-anfetamina (2 mg en 10 ml de agua destilada).

-Tert-Butanol. (Sigma Aldrich, S.A.). Se preparó una solución con tert-butil-alcohol al 10% v/v (10 ml en 100 ml de agua destilada).

-Metanol. (Panreac Química S.L.). Se preparó una solución de metil-alcohol al 20% v/v (20 ml en 100 ml de agua destilada).

**Aparataje.** Se introdujo un nuevo sistema de registro de la actividad locomotora en campo abierto. Este se realizó de manera automática utilizando un sistema computerizado con videocámara (SMART, Letica, S.A.). Dicho sistema registraba el desplazamiento del animal en el mismo campo abierto utilizado en los experimentos precedentes, pero en este caso no contabilizaba los cruces de cuadrante (como en el registro manual) sino los centímetros totales realizados por el animal. En el resto de fases experimentales de la presente tesis se utilizó este sistema de registro en los experimentos donde la variable conductual fue la actividad locomotora.

**Procedimiento.** En este caso, el intervalo entre tratamientos (administración aguda IP de acetato de plomo y administración aguda IP de la respectiva droga) quedó fijado para todos los experimentos en 7 días y la dosis de acetato de plomo fue 100 mg/kg (IP) dado que fueron la dosis y el intervalo temporal en los cuales más inducción de la catalasa y de la actividad locomotora inducida por etanol se observaron como consecuencia de la administración del plomo. Asimismo, en ese tiempo no aparecieron efectos deletéreos del plomo sobre la deambulaci3n espontánea ni sobre el peso de los animales.

El dise1o experimental que planteamos fue de dos factores con dos niveles cada uno: Dosis de acetato de plomo (0 / 100 mg/kg) x Dosis de la droga (0 / la correspondiente a cada droga).

Las sesiones de medici3n de la actividad locomotora para el etanol, la *d*-anfetamina y el metanol comprendían un total de veinte minutos medidos inmediatamente despu3s de la administraci3n (IP) de la correspondiente droga. Inmediatamente tras la inyecci3n, cada animal era introducido individualmente en el campo abierto donde permanecía durante un periodo de 20 minutos. Los primeros 10 minutos fueron desechados del computo final para reducir el efecto de variables contaminantes (manipulaci3n, novedad, absorci3n de las drogas, etc.) (KELLEY, 1993; DUDEK y TRITTO, 1994). La medici3n de la actividad locomotora se realiz3 durante los últimos diez minutos.

S3lo en el caso de la prueba con t-butanol el registro se realiz3 durante los primeros 15 minutos tras la administraci3n del alcohol, aunque s3lo se consideraron los últimos 10 minutos. Este criterio se emple3 tras comprobar que los efectos inductores del t-butanol sobre la actividad locomotora decaían drásticamente pasados los 15 minutos desde su administraci3n, por ello nos vimos forzados a adelantar el registro. Este dato ha encontrado posterior apoyo en la bibliografía acerca de la farmacocinética del t-butanol, ya que se trata de un alcohol alifático cuya distribuci3n por el organismo es muy rápida (POET y cols., 1997).

El etanol fue administrado a la dosis que mayor inducci3n de la actividad locomotora había demostrado en experimentos precedentes (2.5 mg/kg, IP). Para la prueba con *d*-anfetamina empleamos 2.0 mg/kg administrados de manera aguda IP. Esta dosis junto a las de t-butanol y la del metanol aparecen en la bibliografía revisada como inductoras de la deambulaci3n en ratones (DUDEK y PHILLIPS, 1983). En el caso del tert-butanol la dosis fue 0.5 mg/kg administrados de manera aguda IP. Es una

dosis mucho menor que la utilizada en los experimentos con etanol porque, aunque la densidad de ambos alcoholes es muy parecida (0.78), el peso molecular del t-butanol (74.12) es casi el doble que el del etanol (46.07). Sin embargo, ya que el peso molecular del etanol y del metanol son muy parecidos (32.04 y 46.07 respectivamente), empleamos dosis equivalentes. La dosis de metanol fue (2.5 g/kg).

## **II. Análisis Estadísticos.**

Todos los datos fueron analizados utilizando pruebas estadísticas paramétricas. En concreto en todos los experimentos de la presente fase se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) donde las variables fueron entre sujetos en todas las pruebas. En los casos en los que se consideró necesario se aplicó un análisis *post hoc* de la interacción de los factores principales, para ver las diferencias entre grupos. Dicha prueba fue Fisher's Least Significant Difference Tests (LSD). Las tablas con los resultados de dichos análisis aparecen en el apartado de Apéndices.

El programa estadístico utilizado fue STATISTICA 4.1. para MAC.

## Resultados.

### 2.1. Actividad locomotora inducida por etanol.

Un ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de etanol (0.0 / 2.5 g/kg), confirmó los datos que ya habíamos observado en anteriores pruebas con otro tipo de registro. Los dos factores así como la interacción resultaron ser significativos. El factor dosis de plomo:  $F(1,32)=5.1$ ,  $p<0.05$ . El factor dosis de etanol:  $F(1,32)=78.7$ ,  $p<0.01$ . Y la interacción entre ambos factores:  $F(1,32)=6.3$ ,  $p<0.01$ .

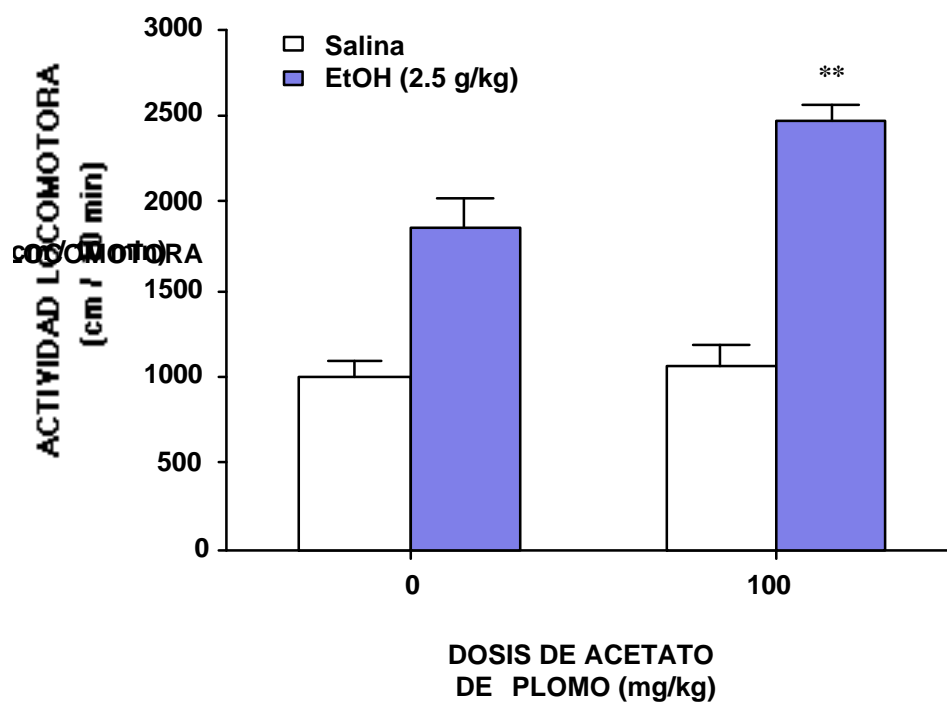


FIGURA N° 2.1.: Efecto de la administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora espontánea o inducida por etanol (2.5 g/kg, IP). Siete días antes de la administración de etanol los animales fueron inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (centímetros recorridos durante 10 minutos) (n=9 por grupo). (\*\*  $p<0.01$  significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AcPb /EtOH).

El análisis *post hoc* LSD confirmó que en los grupos pretratados con salina la dosis de etanol 2.5 g/kg inducía la actividad locomotora en relación al grupo inyectado con salina ( $p<0.01$ ). Los grupos inyectados con la dosis de etanol 0.0 g/kg no fueron

diferentes entre sí, por lo que el tratamiento con plomo *per se* no afecta a la actividad locomotora espontánea. Por último y más importante, el plomo en interacción con el etanol potenció la actividad locomotora en relación al grupo pretratado con salina al que se le inyectó etanol el día del test ( $p < 0.01$ ).

## **2.2. Actividad locomotora inducida por *d*-anfetamina.**

En la presente prueba se repitió el diseño experimental anterior a fin de poder comparar los resultados. Utilizamos la dosis de *d*-anfetamina: 2.0 mg/kg administrados de manera aguda IP.

El ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de *d*-anfetamina (0.0/ 2.0 mg/kg), mostró que sólo el factor dosis de anfetamina resultó ser significativo ( $F(1,32)=24.6$ ,  $p < 0.01$ ), lo que demuestra que la dosis de anfetamina empleada (2.0 mg/kg) produjo una inducción de la actividad locomotora en relación a la dosis 0.0 mg/kg, en ambos grupos de pretratamiento. El factor pretratamiento no resultó ser significativo ni tampoco la interacción entre ambos factores.

El análisis *post hoc* LSD confirmó que en los grupos pretratados con salina la dosis de anfetamina 2.0 mg/kg induce la actividad locomotora en relación al grupo inyectado con salina ( $p < 0.01$ ). Los grupos inyectados con la dosis de anfetamina 0.0 mg/kg no fueron diferentes entre sí, por lo que el tratamiento con plomo *per se*, una vez más, no afecta a la actividad locomotora espontánea. Por último, como era esperable a tenor de los resultados del ANOVA, el plomo en interacción con la anfetamina no potencia la actividad locomotora en relación al grupo pretratado con salina.

Los resultados gráficos aparecen en la figura 2.2.

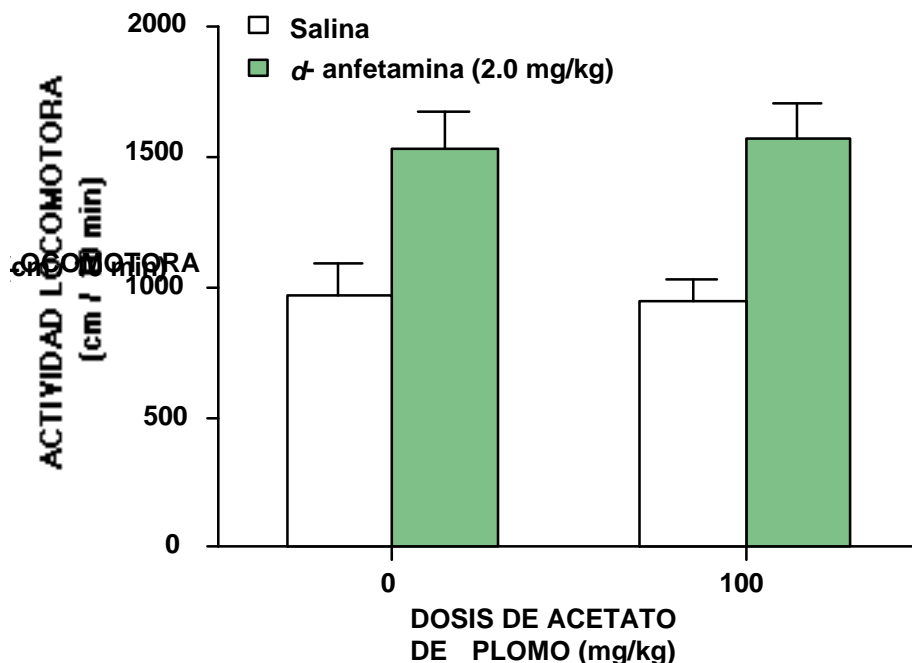


FIGURA N° 2.2.: Efecto de la administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora espontánea o inducida por d-anfetamina (2.0 mg/kg, IP). Siete días antes de la administración de la anfetamina los animales fueron inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (centímetros recorridos durante 10 minutos) (n=9 por grupo).

### 2.3. Actividad locomotora inducida por tert-butanol.

El ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x Dosis de t-butanol (0.0 / 0.5 g/kg), mostró que sólo el factor dosis de t-butanol resultó ser significativo ( $F(1,36)=16.7$ ,  $p<0.01$ ), lo que demuestra que la dosis de t-butanol elegida producía una inducción de la actividad locomotora en relación a la dosis 0.0 g/kg, en ambos grupos de tratamiento. El factor dosis de plomo no resultó ser significativo ni tampoco la interacción entre ambos factores.

El análisis *post hoc* LSD confirmó que: en los grupos pretratados con salina la dosis de tert-butanol 0.5 g/kg induce la actividad locomotora en relación al grupo inyectado con salina ( $p<0.01$ ). Los grupos inyectados con la dosis de tert-butanol 0.0 g/kg no fueron diferentes entre si. Finalmente, el plomo en interacción con este alcohol no potencia la actividad locomotora en relación al grupo que no recibió plomo.

Los resultados gráficos aparecen en la figura 2.3.

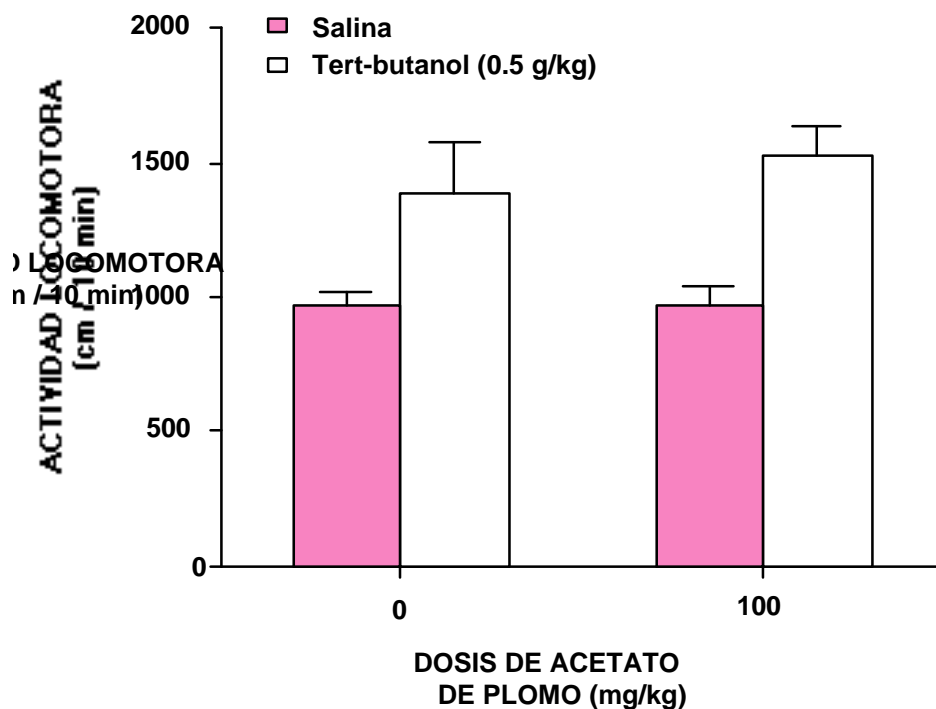


FIGURA N° 2.3.: Efecto de la administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora espontánea o inducida por tert-butanol (0.5 g/kg, IP). Siete días antes de la administración del tert-butanol los animales fueron inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (centímetros recorridos durante 10 minutos) (n=10 por grupo).

#### 2.4. Actividad locomotora inducida por metanol.

Tal como habíamos predicho los resultados del ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de metanol (0.0 / 2.5 g/kg), mostraron diferencias en relación a lo observado en los experimentos con *d*-anfetamina o con tert-butanol, donde el plomo no afectó la actividad inducida por dichas drogas.

Los dos factores así como la interacción, resultaron ser estadísticamente significativos. El factor dosis de metanol dio ( $F(1,36)=37.3$ ,  $p<0.01$ ). Esto demuestra que la dosis de metanol utilizada producía en general una inducción de la actividad locomotora en relación a la dosis 0.0 g/kg. El factor dosis de plomo dio ( $F(1,36)=7.1$ ,  $p<0.01$ ) lo que demuestra un efecto del plomo sobre la actividad locomotora, y la interacción entre ambos factores dio ( $F(1,36)=10.2$ ,  $p<0.01$ ).



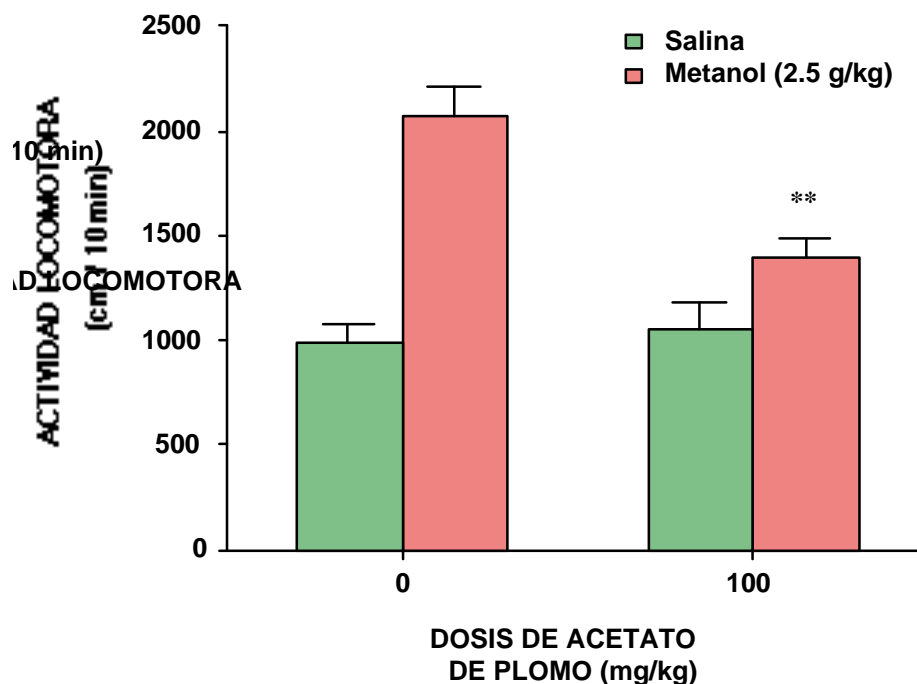


FIGURA N° 2.4.: Efecto de la administración aguda de acetato de plomo sobre la actividad locomotora espontánea o inducida por metanol (2.5 g/kg, IP). Siete días antes de la administración del metanol los animales fueron inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora (centímetros recorridos durante 10 minutos) (n=10 por grupo). (\*\*p<0.01 significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AcPb/ metanol).

El análisis *post hoc* LSD confirmó que en los grupos no tratados con plomo la dosis de metanol 2.5 g/kg inducía la actividad locomotora en relación al grupo inyectado con 0.0 g/kg de metanol ( $p < 0.01$ ). También pudimos observar este efecto en los grupos pretratados con plomo; el metal indujo la actividad locomotora en relación al que no recibió metanol, aunque el nivel de significación fue menor ( $p < 0.05$ ). Los grupos inyectados con la dosis de metanol 0.0 g/kg no fueron diferentes entre sí. Finalmente, el plomo en interacción con este alcohol deprimió la actividad locomotora en relación al grupo que no había recibido plomo ( $p < 0.01$ ). El plomo en interacción con el metanol produjo el efecto contrario que en interacción con el etanol.

## Discusión de los resultados.

Dos son las conclusiones principales de la presente fase experimental. Por un lado, se reprodujo el principal resultado obtenido en la fase precedente: el plomo potenció la actividad locomotora inducida por etanol, aunque en la presente serie de resultados esta variable conductual fue registrada utilizando un sistema computerizado que evaluaba los centímetros totales que el animal realizaba en el campo abierto. Hemos podido comprobar que la potenciación de la inducción que produce el etanol es menor si el registro se realiza contabilizando el total de centímetros que recorre el animal en lugar de los cruces de cuadrante (40% en lugar de 70%). Este efecto suavizador de las diferencias entre grupos cuando la actividad locomotora se registra con un sistema computerizado o manualmente ha sido observado en otros estudios (NELSON y cols., 1997). Pero lo más importante es que el efecto del plomo en interacción con el etanol nuevamente aparecía.

Por otro lado, los resultados obtenidos demuestran que el plomo sólo potencia la conducta inducida por etanol. Ninguna de las otras sustancias inductoras de la actividad locomotora modificaron su efecto sobre dicha conducta al ser administradas en animales pretratados con plomo en relación a animales control, a excepción del metanol que interaccionó con el plomo de manera depresora.

Los datos obtenidos en las pruebas con *d*-anfetamina son congruentes con datos precedentes obtenidos en nuestro laboratorio sobre especificidad en la utilización del inhibidor selectivo de la catalasa azida sódica (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999a) y la cianamida (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999b). En dichos estudios, la inhibición de la catalasa producida por la azida sódica no afectó la actividad locomotora inducida por una dosis de *d*-anfetamina en relación a sujetos control. También encontramos precedentes en la utilización de inhibidores de la catalasa (AT) y drogas catalogadas como estimulantes psicomotores como la cocaína (ARAGON y AMIT, 1993). En éste estudio se probó la especificidad del efecto de inhibición de la catalasa utilizando AT, en una estirpe de ratones con una mutación: la acatalasemia. Los ratones, tanto si eran acatalasémicos como si no (la misma estirpe de ratones sin la mutación), no mostraron diferencias en la actividad locomotora inducida por cocaína cuando se les administraba AT. Por lo tanto, las manipulaciones de la catalasa consistentemente producen cambios en las conductas inducidas por etanol, pero no en las conductas producidas por otras drogas que también poseen efectos psicomotores.

En relación a los dos alcoholes utilizados: metanol y t-butanol, ambos produjeron un efecto inductor de la actividad locomotora en los animales control, dato que reproduce los ya hallados por otros autores (DUDEK y PHILLIPS, 1983). Sin embargo, este efecto no fue alterado significativamente por el pretratamiento con plomo en el caso del t-butanol. Nuestro resultado es congruente con nuestra hipótesis (el plomo induce la actividad de la catalasa) si tenemos en cuenta que el metabolismo de este alcohol no se produce vía la catalasa, ni por ningún sistema microsomal de monoxigenasas hepáticas (TURINI y cols., 1998), aunque sí parece que su metabolismo es oxidativo (BERNAUER y cols., 1998).

En el caso del metanol, sí que apareció una clara reducción de la actividad locomotora en los animales pretratados con plomo e inyectados con metanol. Es decir, el plomo administrado de manera aguda interfiere de manera antagónica con el efecto inductor de la actividad locomotora producido por el metanol. El metabolismo hepático del etanol se realiza principalmente, en un 60%, por la ADH (BRADFROD y cols., 1993), sin embargo, la catalasa hepática tiene una alta afinidad por el metanol. De hecho este alcohol ha sido utilizado en pruebas donde se pretende observar la competición entre etanol y metanol por el compuesto I tanto *in vitro* (GILL y cols., 1992), como *in vivo* (TAMPIER y cols., 1988). Por ello si el sistema enzimático responsable del metabolismo periférico del metanol (catalasa-peróxido de hidrógeno) está inducido, los niveles de este alcohol que lleguen al cerebro serán menores y por lo tanto su efecto inductor en conducta también lo será. Junto a este efecto, pudiera ocurrir que se esté favoreciendo un aumento de los niveles de formaldehído que circulan por todo el organismo. El formaldehído, primer metabolito del metanol, resulta tóxico para muchos sistemas orgánicos incluido el cerebro (BENDER y cols., 1982; BOJA y cols., 1985). Quizá el decremento observado en actividad locomotora, sea una manifestación de dicha toxicidad.

Por otro lado, los antecedentes de las repercusiones conductuales de la administración de formaldehído encontrados, demuestran que la inhalación de este aldehído produce una disminución de la actividad locomotora (BOJA y cols., 1985) en ratas. En el presente estudio los resultados podrían ser análogos si consideramos que es el metabolito del metanol el que está ejerciendo una gran parte de los efectos de reducción sobre la actividad locomotora de los animales tratados con plomo frente a los controles.

En conclusión, podemos decir que el plomo administrado 7 días antes de manera aguda potencia específicamente la actividad locomotora inducida por etanol y no la de otros alcoholes o psicoestimulantes como la *d*-anfetamina.

***FASE EXPERIMENTAL III.***

***EFECTO DEL INHIBIDOR DE LA CATALASA 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE EN INTERACCION CON LA ADMINISTRACION AGUDA DE ACETATO DE PLOMO.***

**III**

## **Introducción.**

En esta parte hemos considerado interesante comprobar que el plomo modifica la probada inhibición de la catalasa mediante inhibidores específicos como el AT. Para ello en la presente fase experimental nos centramos en comprobar dichos aspectos.

El 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT), es un potente inhibidor del compuesto I (HEIM y cols., 1955; 1956) que ha demostrado su efecto tanto *in vitro* (De MASTER y cols., 1988) como *in vivo* (ARAGON y cols., 1991b; GILL y cols., 1992).

Se trata, con toda seguridad, del inhibidor de la catalasa más utilizado en estudios bioconductuales. En general el AT produce una reducción de algunos efectos inducidos por el etanol. Por ejemplo, en roedores el AT administrado previamente al etanol ha demostrado reducir la depresión en la actividad locomotora de ratas (ARAGON y cols., 1989) y reducir la inducción que produce en ratones (ARAGON y cols., 1992a; ARAGON y AMIT, 1993). También se ha observado que acorta la narcosis y antagoniza la letalidad producida por altas dosis de etanol en ratas (TAMPIER y cols., 1988; ARAGON y cols., 1991c). El pretratamiento con AT bloquea totalmente el condicionamiento aversivo de sabor (ARAGON y cols., 1985a) y reduce la liberación de corticoesterona producidos por etanol (ARAGON y AMIT, 1987). Por último la administración de AT de manera aguda produce una reducción (dependiente de la dosis de AT) de la ingesta voluntaria de etanol tanto en ratas (ARAGON y AMIT, 1992; ROTZINGER y cols., 1994; TAMPIER y cols., 1994) como en ratones (KOECHLING y AMIT, 1994).

Estas acciones del AT son específicas para el etanol ya que el AT no atenúa los efectos conductuales inducidos por otras drogas tales como morfina, cloruro de litio, pentobarbital (TAMPIER y cols., 1988; ARAGON y cols., 1985a) o cocaína (ARAGON y AMIT, 1993).

La solidez demostrada por esta manipulación farmacológica permite utilizarla como un criterio de validación adicional para otros compuestos que supuestamente realicen sus acciones a través de la catalasa o del compuesto I.

En este sentido, resulta una herramienta farmacológica interesante para observar los efectos de otro inhibidor o potenciador de la catalasa que deberían sumar o restar respectivamente, sus efectos a los del aminotriazole. Así lo indican los datos procedentes de un reciente estudio (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999) donde, al efecto inhibitorio sobre la catalasa del AT, se le sumó el efecto, sobre esta misma enzima, de la cianamida. También podríamos considerar una manipulación parecida los datos con AT procedentes de ratones mutantes acatalasémicos (ARAGON y AMIT, 1993). En este estudio los animales acatalasémicos (que tienen una menor actividad locomotora inducida por etanol que los animales control) muestran una disminución proporcional a la que experimentan los ratones normales de la misma cepa en la actividad locomotora inducida por etanol cuando ambos grupos han sido pretratados con AT.

Otro antecedente de este tipo de manipulaciones podemos encontrarlo en un estudio *in vitro* (ARAGON y cols., 1992b). En este trabajo muestras homogeneizadas de cerebro perfundido de rata a los que se les añadía etanol y se registraba la posterior formación de acetaldehído, fueron utilizados para observar el efecto de diferentes manipulaciones de la catalasa. Una manipulación potenciadora de la actividad de la catalasa fue incubarlos con glucosa oxidasa previamente a la adición de etanol al medio. La glucosa oxidasa oxida la glucosa y con ello actúa como un sistema generador de peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de catalasa puede promover la oxidación peroxidática del etanol. Por lo tanto la adición al medio de la glucosa oxidasa actuó como un potenciador de la actividad de la catalasa al facilitar la producción de peróxido de hidrógeno que, en condiciones fisiológicas, es el factor limitante para la catalasa encefálica. Posteriormente, en este estudio, al cultivo con glucosa oxidasa se le añadió AT. El resultado fue un descenso en la producción de acetaldehído en relación al cultivo en el que se administró sólo glucosa oxidasa, aún así los niveles de acetaldehído fueron superiores a los obtenidos en los controles (cultivos a los que no se le añadió ningún modulador de la actividad de la catalasa).

Como hemos mencionado en las fases experimentales anteriores del presente trabajo doctoral, hasta la fecha, no se ha utilizado ninguna herramienta farmacológica *in vivo* para inducir la actividad de la catalasa encefálica. Por ello, pretendíamos verificar que la interacción entre un inhibidor de la catalasa como el AT y un inductor como el plomo se ejercería de manera opuesta a lo observado cuando se han utilizado dos compuestos inhibidores. Así, la presente fase experimental fue diseñada para evaluar la supuesta sustracción de efectos entre acetato de plomo agudo y aminotriazole.

Analizamos para ello diferentes dosis de plomo y diferentes dosis de AT, pero siempre manteniendo constantes los intervalos temporales entre la administración de todas las sustancias. Las variables dependientes importantes fueron nuevamente, la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de la enzima cerebral catalasa. Realizamos de nuevo un análisis correlacional de ambas variables.

Nuestras hipótesis fueron las siguientes:

1.- Ni la administración de AT, ni la de acetato de plomo por separado producirían ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea en los animales. Tampoco lo haría la administración conjunta de ambas sustancias.

2.- El aminotriazole provocaría una reducción de la actividad peroxidática de la catalasa, y consecuentemente, una reducción de la actividad locomotora inducida por etanol que sería dependiente de la dosis.

3.- El plomo iba a provocar una potenciación de la actividad de la catalasa cerebral y de la actividad locomotora inducida por etanol en todas las dosis. Utilizamos las dos dosis de acetato de plomo que en la primera fase demostraron potenciar ambas variables (50 y 100 mg/kg), dado que en la presente únicamente nos interesan los efectos potenciadores del plomo.

4.- Plomo y AT mostrarían sus efectos de forma sustractiva sobre la actividad de la catalasa y sobre la deambulacion inducida por etanol. Es decir, el AT iba a reducir el incremento producido por el plomo sobre ambas variables y lo haría de manera dosis-dependiente.

5.- Predijimos que dado todo lo anterior iba a parecer una correlación entre el efecto de estas dos sustancias en actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la enzima cerebral catalasa.

6.- La administración de ambas sustancias no iba a afectar los niveles periféricos de etanol en relación a animales control y esperábamos que en caso de que así fuera, esta alteración sería independiente de la dirección tomada por los efectos conductuales observados.



## **Materiales y métodos.**

### **I. Estudios Conductuales.**

**Sujetos y Condiciones de Alojamiento.** Para el presente experimento se utilizaron ratones Swiss de las características ya especificadas. Tampoco las condiciones de alojamiento o manipulación presentan ningún cambio destacable respecto a las precedentes fases.

**Aparataje.** En toda esta fase la actividad locomotora se registró de manera automatizada con el sistema SMART anteriormente descrito. Dicho sistema registra el desplazamiento del animal en el mismo campo abierto utilizado en los experimentos precedentes, contabilizando los centímetros totales realizados por el animal.

**Drogas.** Las sustancias empleadas en los tratamientos aplicados a los sujetos experimentales fueron administradas de manera aguda con una inyección intraperitoneal (IP). Son las siguientes:

- Acetato de Plomo (Panreac Química S.L.). Se preparó una solución de acetato de plomo disuelto en agua destilada a una concentración de 0.5 mg/ 10 ml. Las diferentes dosis empleadas fueron siempre tomadas de esta solución estándar.

- Solución Salina. Se preparó una solución de cloruro sódico (Panreac Química S.A.) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.9%.

- Etanol. Se preparó una solución de alcohol etílico de 96° (Panreac Química S.A.) al 20% v/v (21 ml en 100 ml de agua destilada).

-Aminotriazole. 3-amino-1, 2, 4-triazole, (AT) (Sigma Aldrich, S.A.). La solución estandard preparada tenía una concentración de 0.5 g de AT en 10 ml de agua destilada. Las diferentes concentraciones utilizadas en las pruebas se obtuvieron diluyendo la solución estandard.

- Ketamina. Se preparó una solución de ketamina (5 g en 10 ml) a partir de un preparado comercial (Imalgene, Rhone Merieux Labs.) del cual se tomaron 0.6 ml, que se disolvieron en 5.4 ml de agua destilada. Con este producto se anestesió a los ratones antes de ser sacrificados para la toma de muestras de tejido.

**Procedimiento.** Transcurrida una semana desde su llegada al laboratorio, durante la cual los animales se aclimataron a las condiciones del estabulario, los ratones se dividieron en tres grupos de igual número. En estas pruebas, todos los animales recibieron tres tratamientos farmacológicos diferentes. Así, los animales fueron inicialmente divididos en tres grupos que recibían distintas dosis de plomo (0, 50 ó 100 mg/kg). Inmediatamente después de la administración del plomo, los animales eran devueltos a sus cajas donde permanecían hasta el día de la realización del test. El día de la administración del plomo, los animales tenían 5 semanas de edad y su peso promedio era de  $32 \pm 3$  gramos.

Una semana después, en el día del test, los animales recibieron una administración de AT (0, 10 ó 500 mg/kg). Finalmente, tras un intervalo de cinco horas, a todos los animales se les inyectó una dosis de 2.5 g/kg de etanol y se evaluó su deambulación en el campo abierto o bien fueron sacrificados para la obtención de los diferentes tejidos: cerebro o sangre.

Las sesiones de medición de la actividad locomotora comprendían un total de veinte minutos medidos inmediatamente después de la administración (IP) del etanol. La medición de la actividad locomotora se realizó durante los últimos diez minutos (KELLEY, 1993; DUDEK y TRITTO, 1994).

Las dosis de acetato de plomo utilizadas fueron 0, 50 ó 100 mg/kg administradas una única vez vía intraperitoneal (IP). Elegimos estas dosis de plomo por ser las que mostraron ejercer un efecto potenciador en las anteriores fases. Se fijó el tiempo de latencia entre el plomo y la administración de los otros tratamientos en 7 días. En el caso del AT, se eligieron las dosis de 0, 10 y 500 mg/kg administrados 5 horas antes de la realización de los test conductuales o bioquímicos, porque en estudios realizados en nuestro laboratorio habían demostrado su capacidad para reducir la actividad locomotora inducida por etanol (ESCARABAJAL y cols., 1999). La dosis de etanol empleada en esta prueba (2.5 g/kg) fue elegida por ser la dosis que demostró provocar, en interacción con el plomo, la máxima potenciación de la actividad locomotora inducida.

El diseño fue bifactorial en todos los casos: Dosis de plomo x dosis de AT, evaluándose por una parte el efecto de diferentes dosis de plomo y por otra, el efecto de diferentes dosis de aminotriazole. Sólo inicialmente realizamos un control de los efectos de ambas drogas sobre la deambulación espontánea de los animales, en el resto de pruebas la deambulación fue inducida por etanol.

## **II. Estudios Bioquímicos.**

Las variables dependientes registradas fueron los niveles de actividad catalítica de la enzima cerebral catalasa y los niveles de etanol en sangre.

El tratamiento de la muestra, los productos químicos utilizados, el aparataje y el procedimiento fueron los mismos que los descritos en el apartado de estudios bioquímicos de la fase experimental I.

## **III. Análisis Estadísticos.**

Todos los datos fueron analizados utilizando pruebas estadísticas paramétricas. En concreto en todos los experimentos de la presente fase se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) donde las variables fueron entre sujetos en todas las pruebas. En los casos en los que se consideró necesario se aplicó un análisis *post hoc* de la interacción de los factores principales, para ver las diferencias entre grupos. Dicha prueba fue Fisher's Least Significant Difference Tests (LSD). Las tablas con los resultados de dichos análisis aparecen en el apartado de Apéndices.

La covariación de las medidas de actividad locomotora inducida por etanol y de actividad de la catalasa cerebral para los grupos sometidos al mismo tratamiento se cuantificó mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson.

El programa estadístico utilizado fue STATISTICA 4.1. para MAC.

## Resultados.

### 3.1. Actividad locomotora espontánea de ratones en campo abierto.

Para la presente prueba elegimos la dosis más alta de plomo y AT que íbamos a utilizar después en interacción con el etanol: 100 mg/kg y 500 mg/kg respectivamente. Asumimos que si estas dosis no alteraban la deambulaci3n espontánea, tampoco lo harían dosis menores de ambos productos.

TABLA 3.1.

EFFECTO DEL ACETATO DE PLOMO Y EL AMINOTRIAZOLE  
SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTANEA  
(cm/10 min)

AcPb (mg/kg)	AT (mg/kg)	
	0	500
0	1039.9 ± 79.4	1134.4 ± 40.9
100	1009.4 ± 124.0	1163.0 ± 78.0

Media ± EMS de la actividad locomotora espontánea medida en campo abierto (centímetros recorridos en 10 minutos). Los ratones fueron inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP) siete días antes de ser inyectados con AT (0 ó 500 mg/kg, IP) y el test se realizó 5 horas después de la administraci3n de AT (n=9 por grupo).

Para comprobar estos efectos se realizó un análisis de varianza cuyos factores fueron: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de AT (0 / 500 mg/kg). Los resultados del mismo demostraron que no existían diferencias significativas en ninguno de los factores ni en la interacci3n. Por lo tanto, concluimos que ninguno de los tratamientos ni la coadministraci3n de los mismos alteraba la deambulaci3n espontánea de los ratones en un campo abierto.

### 3.2. Dosis de AT en interacción con acetato de plomo.

En los dos experimentos que presentamos a continuación mantuvimos constantes la administración de acetato de plomo (100 mg/kg, administrados IP 7 días antes del test) en todos los grupos experimentales. Los grupos control recibieron un volumen equivalente de solución salina. Elegimos la dosis de plomo que maximizaba los efectos potenciadores de las variables dependientes que íbamos a registrar: actividad locomotora inducida por etanol y actividad de la enzima cerebral catalasa. Creemos necesario recordar que en el experimento de actividad locomotora, todos los animales recibieron una dosis de etanol 2.5 g/kg administrado IP justo antes de la prueba.

De un amplio rango de dosis de AT utilizadas en un estudio piloto bajo las mismas condiciones y sujetos experimentales que los empleados en estos trabajos (datos no presentados), elegimos dos muy distantes que producían efectos de diferente magnitud en la reducción de la actividad locomotora: 10 y 500 mg/kg. Asimismo, utilizamos como control de los efectos del AT un grupo inyectado con solución salina (grupos con 0 mg/kg de AT).

**3.2.1. Actividad locomotora.** El diseño experimental determinó dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x Dosis de AT (0/ 10 / 500 mg/kg). Todos los animales recibieron una inyección de etanol de 2.5 g/kg.

El resultado del ANOVA dio como significativos los dos factores principales. El factor dosis de plomo fue significativo ( $F(1,48)=19.2$ ,  $p<0.01$ ). La administración de plomo afecta significativamente a la actividad locomotora inducida por etanol en relación a animales inyectados con salina y esto lo hace independientemente de la dosis de AT administrada. También apareció un efecto significativo de la dosis de AT ( $F(2,48)=10.4$ ,  $p<0.01$ ), lo cual indica que el AT en general también afectó a la actividad locomotora inducida por etanol. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de la interacción entre ambas sustancias.

Los análisis *post hoc* LSD indicaron que, como era esperable, los grupos salina (no inyectados con plomo) inyectados con 10 y 500 mg/kg de AT redujeron significativamente la actividad locomotora inducida por etanol en relación al grupo inyectado con la dosis 0 mg/kg de AT y 0 mg/kg de plomo ( $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente). También el plomo (grupos con la dosis de AT 0 mg/kg) potenció significativamente la actividad locomotora inducida por etanol ( $p<0.01$ ) en relación al control. Este efecto se dio dentro de cada dosis de AT entre el grupo salina y el grupo

tratado con plomo: en las dosis de AT 10 mg/kg ( $p < 0.05$ ) y en la de 500 mg/kg la significación de la diferencias entre los grupos plomo y salina tuvo una probabilidad de error  $p < 0.01$ .

En la figura 3.2.1. aparecen los resultados de este experimento.

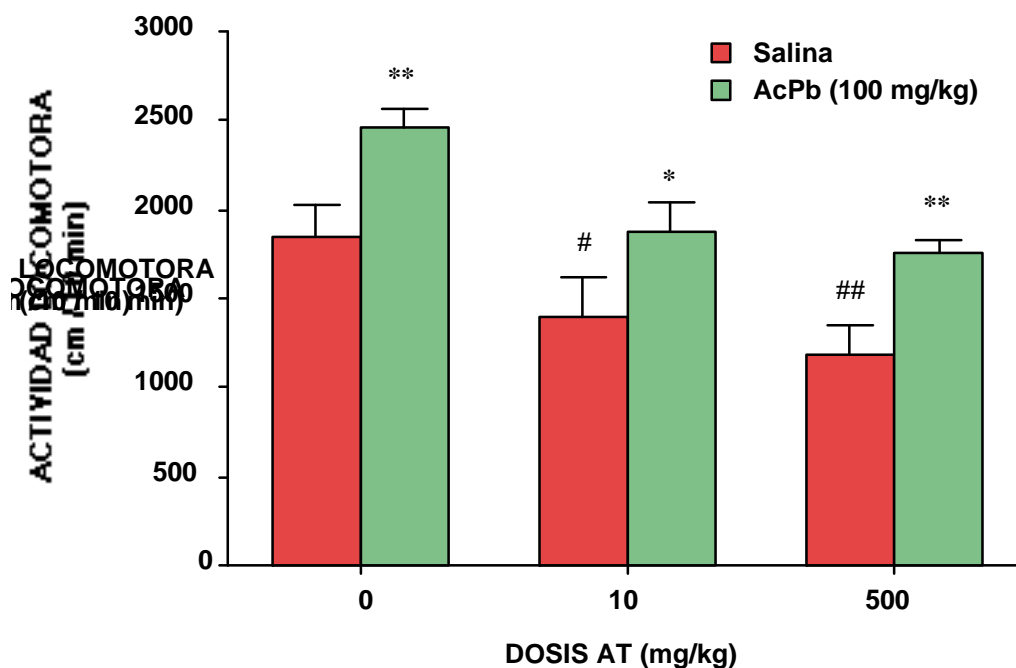


FIGURA N° 3.2.1.: Efecto de diferentes dosis de AT sobre la potenciación que el acetato de plomo produce en la actividad locomotora inducida por etanol. Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora en campo abierto (centímetros recorridos en 10 minutos). El AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP) fue inyectado a los ratones 7 días antes del test. El día del test, a los ratones se les inyectó una dosis de AT (0, 10 ó 500 mg/kg, IP) 5 horas antes de la administración de etanol (2.5 g/kg, IP) ( $n=9$  por grupo). (\*\* $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo salina en la respectiva dosis de AT) (## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AT/ AcPb).

Como puede observarse, el plomo (100 mg/kg) provocó una potenciación de la actividad locomotora inducida por etanol. Este efecto, se mantuvo proporcionalmente constante en función de los diferentes niveles de inhibición que propiciaron las distintas dosis de AT. Por otra parte, se puede comprobar que el AT presentó una respuesta dosis-dependiente, es decir, que sus efectos supresores en la actividad locomotora, estaban en relación directa con la dosis que se administró.

**3.2.2. Actividad de la catalasa encefálica.** En este caso se aplicó el mismo diseño experimental que en el test precedente de actividad locomotora. Es decir, dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de AT (0 / 10 / 500 mg/kg). Se repitieron las condiciones experimentales utilizadas en actividad locomotora con otros animales (animales que no habían recibido etanol) para realizar la correlación posterior.

El resultado del ANOVA reveló como significativos los dos factores principales. La dosis de plomo administrada fue modificó significativamente la actividad de la catalasa ( $F(1,30)=18.0$ ,  $p<0.01$ ), independientemente de la dosis de AT administrada. También apareció un efecto significativo de la dosis de AT ( $F(2,30)=12.2$ ,  $p<0.01$ ), lo cual indica que el AT en general también afectó a la actividad de esta enzima. Al igual que en el estudio de actividad locomotora, no hubo un efecto significativo de la interacción entre ambas sustancias.

Los análisis *post hoc* LSD indicaron que estas diferencias eran totalmente paralelas a las observadas en actividad locomotora inducida por etanol. El plomo (100 mg/kg) provocó una potenciación de la actividad de la catalasa. Este efecto, se mantuvo proporcionalmente constante en función de los diferentes niveles de inhibición que propiciaron las diferentes dosis de AT. El AT siguió presentando una respuesta dependiente de la dosis, es decir, que sus efectos supresores en la actividad de la catalasa, estuvieron en relación directa con la dosis que se administraron.

En la tabla 3.2.2. aparecen los resultados.

TABLA 3.2.2.

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE AMINOTRIAZOLE SOBRE LA POTENCIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL PRODUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE ACETATO DE PLOMO

DOSIS DE AcPb (mg/kg)	DOSIS DE AT (mg/kg)	ACTIVIDAD DE LA CATALASA (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteína)
0	0	1.03 ± 0.06
100	0	1.47 ± 0.10**
0	10	0.71 ± 0.04#
100	10	1.02 ± 0.15*
0	500	0.58 ± 0.05##
100	500	0.92 ± 0.15*

Media ± EMS de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) tras la administración de AcPb (0 ó 100 mg/kg) y AT (0, 10 ó 500 mg/kg). Los sujetos fueron sacrificados 5 horas después de la administración de AT en el séptimo día desde la administración aguda de acetato de plomo (n=6 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AcPb y la dosis de AT correspondiente). (##p<0.01, #p<0.05 significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AT/ 0 mg/kg de AcPb).

### 3.3. Dosis de acetato de plomo en interacción con AT.

Esta segunda parte presenta los datos obtenidos al estudiar el efecto de las dosis de plomo potenciadoras de las variables dependientes (actividad locomotora inducida por etanol y actividad de la catalasa encefálica) en relación al inhibidor de la catalasa aminotriazole. En esta ocasión elegimos la dosis más alta de AT para observar como interacciona con las diferentes dosis de plomo. Los grupos control recibieron un volumen equivalente de solución salina.

Como en la serie anterior, en el experimento de actividad locomotora, todos los animales recibieron una dosis de etanol 2.5 g/kg administrado IP justo antes de la prueba.

**3.3.1. Actividad locomotora.** Las dosis de plomo utilizadas fueron: 0, 50 ó 100 mg/kg y las dosis de AT: 0 ó 500 mg/kg.



El resultado del ANOVA dio como significativos los dos factores principales. El factor dosis de plomo afectó significativamente ( $F(2,48)=3.8$ ,  $p<0.05$ ), es decir, la administración de plomo modificó la actividad locomotora inducida por etanol en relación a animales inyectados con salina y esto era independiente de la dosis de AT administrada. También apareció un efecto significativo del tratamiento con AT ( $F(1,48)=14.3$ ,  $p<0.01$ ), lo cual indica que el AT en general también afectó a la actividad locomotora inducida por etanol. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de la interacción entre ambas sustancias.

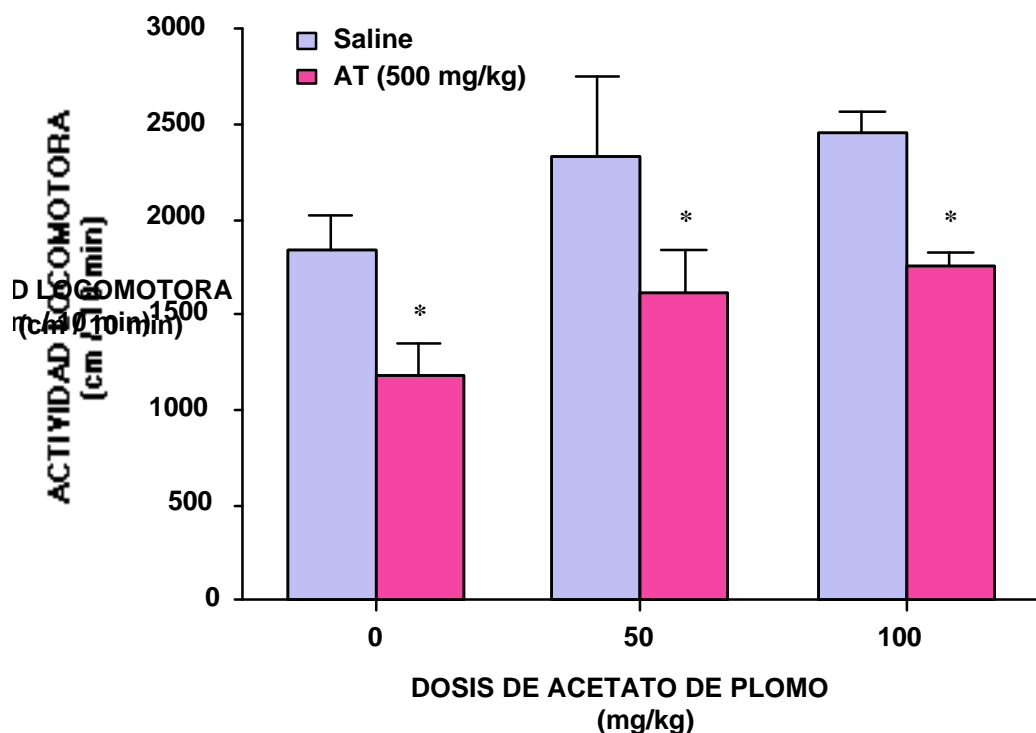


FIGURA N° 3.3.1.: Efecto de diferentes dosis de acetato de plomo sobre el decremento que el AT produce en la actividad locomotora inducida por etanol. Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora inducida por una dosis de etanol (2.5 g/kg, IP) en campo abierto (centímetros recorridos en 10 minutos). El AcPb (0, 50 ó 100 mg/kg, IP) fue inyectado 7 días antes del test. El día del test, fue inyectada una dosis de AT (0 ó 500 mg/kg, IP) 5 horas antes de la administración de etanol (n=9 por grupo). (\*  $p<0.05$  significativamente diferente del grupo salina en la respectiva dosis de AcPb).

Los análisis *post hoc* LSD para comparar las diferencias entre grupos, indican que los grupos inyectados con 500 mg/kg de AT redujeron significativamente la actividad locomotora inducida por etanol en relación al grupo inyectado con la dosis 0 mg/kg de AT y la correspondiente dosis de plomo ( $p<0.05$  en todos los casos).

Como puede observarse, el plomo (50 ó 100 mg/kg) provocó una potenciación de la actividad locomotora inducida por etanol. Esta potenciación de la actividad locomotora también se observó en los grupos inyectados con AT, aunque el porcentaje de reducción que el AT produjo en los animales control (56%) disminuyó a medida que aumentaba la dosis de plomo (una reducción del 44% en los grupos inyectados con 50 mg/kg de plomo y del 40% en los inyectados con 100 mg/kg).

**3.3.2. Actividad de la catalasa encefálica.** Se aplicó el mismo diseño experimental que en el test precedente de actividad locomotora. Es decir, dos factores: Dosis de plomo (0 / 50 / 100 mg/kg) x dosis de AT (0 / 500 mg/kg). Se reprodujeron las condiciones experimentales utilizadas en actividad locomotora para realizar la correlación posterior.

El resultado del ANOVA reveló como significativos los dos factores principales. El tratamiento con plomo fue significativo ( $F(2,30)=4.5$ ,  $p<0.01$ ), independientemente de la dosis de AT administrada. También apareció un efecto significativo de la dosis de AT ( $F(1,30)=22.6$ ,  $p<0.01$ ), lo cual indica que el AT en general también afectó a la actividad de esta enzima. Al igual que en el estudio de actividad locomotora, no hubo un efecto significativo de la interacción entre ambas sustancias.

Los análisis *post hoc* LSD indicaron que las diferencias encontradas entre grupos eran similares a las observadas en actividad locomotora inducida por etanol. Es decir, los grupos inyectados con AT eran diferentes de sus respectivos controles con un nivel de confianza del 95% en el caso de la dosis 0 mg/kg de plomo y de 99% para las restantes dosis de plomo. El plomo provocó una potenciación de la actividad de la catalasa. Este efecto se palió por la administración de AT, sin embargo, los porcentajes de inhibición del AT sobre la catalasa encefálica en los grupos inyectados con plomo fueron progresivamente menores que los observados en el grupo cuya dosis de plomo fue 0 mg/kg. Estos porcentajes fueron: 74% de reducción en el caso de los grupos inyectados con 0 mg/kg de plomo, 69% en los grupos inyectados con 50 mg/kg de plomo y 60% entre los grupos inyectados con 100 mg/kg de plomo.

En la tabla 3.3.2. aparecen los resultados.

TABLA 3.3.2.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE DIFERENTES DOSIS DE ACETATO DE PLOMO SOBRE LA REDUCCION DE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL PRODUCIDA POR AMINOTRIAZOLE

DOSIS DE AcPb (mg/kg)	DOSIS DE AT (mg/kg)	ACTIVIDAD DE LA CATALASA (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteína)
0	0	1.03 ± 0.06
0	500	0.58 ± 0.05*
50	0	1.32 ± 0.23
50	500	0.78 ± 0.08**
100	0	1.47 ± 0.10
100	500	0.92 ± 0.15**

Media ± EMS de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) tras la administración de AcPb (0, 50 ó 100 mg/kg) y AT (0 ó 500 mg/kg). Los sujetos fueron sacrificados 5 horas después de la administración de AT en el séptimo día desde la administración aguda de AcPb (n=6 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 significativamente diferente del grupo 0 mg/kg de AT en la dosis de AcPb correspondiente).

### 3.4. Niveles plasmáticos de etanol.

Para contrastar si existían diferencias en los niveles detectados en plasma tras una administración de etanol (2.5 g/kg) analizamos los datos con un ANOVA de tres factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de AT (0 / 500 mg/kg) x tiempo (15 / 30 minutos). El factor tiempo resultó ser significativo (F(1,24)=11.7, p<0.01), a los 30 minutos los niveles de etanol en sangre eran menores que a los 15 minutos en todos los grupos en general. El factor dosis de AT no resultó ser significativo. Sin embargo, sí lo fueron el factor dosis de plomo (F(1,24)=5.4, p<0.05) y la interacción entre la dosis de plomo y la dosis de AT (F(1,24)=4.5, p<0.05).

Con la comparación *post hoc* LSD pudimos comprobar que ningún grupo de los registrados a los 15 minutos (ni los tratados con plomo, ni los tratados con AT ni los que los fueron con ambas sustancias) fue significativamente diferente del grupo control (sólo tratado con salina), así como tampoco lo fueron los grupos evaluados a los 30 minutos del grupo control para ese mismo intervalo de tiempo.

Estos resultados aparecen en la tabla 3.4.

TABLA 3.4.

EFEECTO DE ACETATO DE PLOMO Y AMINOTRIAZOLE SOBRE LOS NIVELES DE ETANOL EN SANGRE (mg/dl).

TIEMPO (minutos)	TRATAMIENTO			
	Salina	AcPb	AT	AcPb-AT
15	269.8 ± 6.3	265.5 ± 18.9	274.0 ± 4.0	250.0 ± 6.3
30	242.5 ± 4.8	244.1 ± 11.8	258.3 ± 2.8	221.7 ± 10.3

Media ± EMS de etanol en sangre (mg/dl) tras una administración aguda IP de 2.5 g/kg de etanol en animales inyectados con AcPb (0 ó 100 mg/kg, IP) 7 días antes y con AT (0 ó 500 mg/kg, IP) 5 horas antes del etanol. La sangre troncal fue recogida 15 ó 30 minutos después de la administración de etanol. (n=4 por grupo).

### 3.5. Correlación entre la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de la catalasa cerebral.

Finalmente, se realizó un estudio correlacional entre dos de las variables dependientes utilizadas: actividad locomotora inducida por etanol y actividad de la catalasa encefálica. Se trata del mismo tipo de estudio presentado con los datos de las fases experimentales I. El motivo de que estos datos no figuren en un estudio conjunto es que, aún siendo el mismo tipo de variables las que se pusieron en relación el procedimiento para el registro de la actividad locomotora cambió en las pruebas de esta tercera fase (en lugar de cruces de cuadrante se midieron centímetros totales de recorrido).

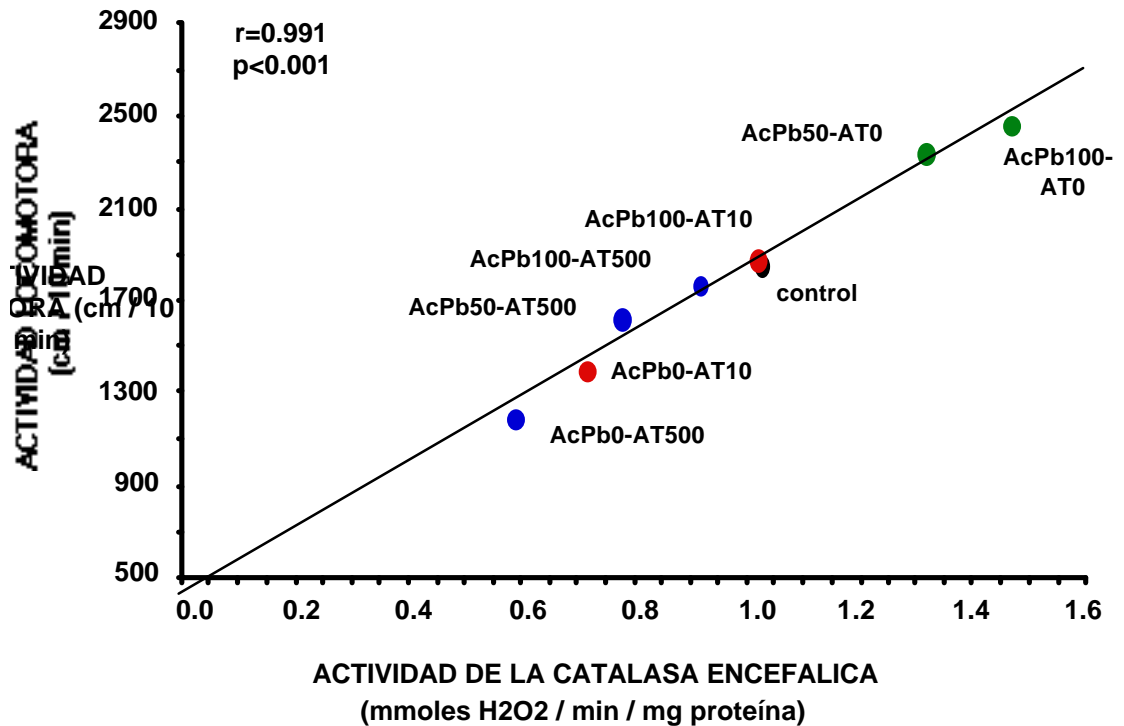


FIGURA N° 3.5.: Relación entre la actividad de la catalasa cerebral en un grupo de ratones tratados con acetato de plomo más aminotriazole y la actividad locomotora inducida por etanol en otro grupo de ratones con el mismo tratamiento. AT (0, 10 ó 500 mg/kg, IP) fue inyectado 7 días después de la administración aguda de AcPb (0, 50 ó 100 mg/kg, IP) y 5 horas antes de la administración de etanol (0 ó 2.5 g/kg, IP) o la extracción del cerebro para la medición de la catalasa. Datos de la fase III.

Se tomaron, por un lado las medias de la actividad locomotora inducida por etanol de los diferentes grupos de tratamiento con plomo y/o AT, y por otro, las medidas de la actividad de la catalasa cerebral para esos mismos grupos de tratamientos pero obtenidos de animales diferentes (nunca inyectados con etanol). La covariación de ambas medidas se cuantificó mediante el coeficiente de Pearson que dio un valor  $r=0.991$ , mostrando que la relación entre ambas resulta estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ).

## Discusión de los resultados.

Los datos obtenidos en esta fase experimental reproducen algunos de los encontrados en las dos anteriores: el plomo ejerció un efecto potenciador de la actividad locomotora inducida por etanol y de la catalasa cerebral. Este efecto se observó nuevamente ante diferentes dosis de acetato de plomo.

La segunda conclusión importante fue demostrar, al igual que lo han hecho otros autores (ARAGON y AMIT, 1993), que el AT reducía tanto la deambulación de los ratones ante una administración aguda de etanol, como la actividad de la catalasa, y lo hizo de manera dependiente de la dosis (ARAGON y AMIT, 1992b; ROTZINGER y cols., 1994; TAMPIER y cols., 1995; KOECHLING y AMIT, 1994; ESCARABAJAL y cols., 1999). En nuestro trabajo, esta inhibición se dio tanto en animales inyectados con plomo, como en aquellos inyectados con solución salina.

Ambos efectos (el inductor del plomo y el inhibidor del AT) sobre la actividad locomotora se ejercieron sin alterar la deambulación espontánea del animal, ni siquiera ante una combinación de ambas sustancias: AT-acetato de plomo. Por los estudios precedentes de esta tesis conocíamos el hecho de que la administración aguda de plomo, a una dosis de 100 mg/kg administrada 7 días antes de la medición conductual, no afectaba la deambulación espontánea de los animales. Tampoco en la literatura, ni en otros trabajos realizados en nuestro laboratorio, el AT mostraba ningún efecto sobre esta variable ni en ratas (ARAGON y cols., 1989), ni en ratones (ARAGON y AMIT, 1993; ESCARABAJAL y cols., 1999). Es más el AT por si mismo no ha producido ninguna modificación en conductas tan diferentes como narcosis o condicionamiento aversivo de sabor (ARAGON y cols., 1985a; 1991a,b; TAMPIER y cols., 1988).

En cuanto al impacto de estos tratamientos sobre el metabolismo periférico del etanol, se apreciaron leves cambios en algunos grupos de tratamiento en relación al control. El grupo inyectado con AT, obtuvo unos valores ligeramente más altos que el control y el grupo tratado con AT y plomo presentaba medias un tanto menores que los control. Sin embargo, la significación hallada en el factor plomo del análisis de varianza no se refleja en los resultados del análisis *post hoc*. De todos modos, el hecho de que los animales tratados en general con plomo manifestaran niveles de etanol en sangre ligeramente inferiores no justificaría el efecto potenciador del plomo sobre la conducta inducida por etanol, ya que la dirección del cambio en los niveles de etanol periférico fueron en sentido inverso a la dirección del cambio en actividad locomotora. Por tanto,

a partir de estos datos no podemos concluir que la interacción entre plomo y AT observada en actividad locomotora pueda ser ocasionada por los leves cambios encontrados en los niveles de etanol en sangre.

Los precedentes que hemos podido revisar acerca de los niveles de etanol en sangre tras una administración de AT presentan una posible contradicción. Una serie muy amplia de trabajos no detecta ninguna modificación de estos niveles cuando el AT es administrado IP (ARAGON y cols., 1985a; 1989; 1992a). Sin embargo, otros autores encuentran diferencias en los niveles plasmáticos de etanol cuando estos superan los 300 mg/dl y se ha utilizado la vía intraperitoneal para la administración del AT (TAMPIER y MARDONES, 1986; 1987; ARAGON y cols., 1991c). En nuestros resultados el AT, ni administrado solo ni con acetato de plomo, afectó esta variable.

Pero lo más destacable de nuestros resultados es que se demostró la interferencia de ambas sustancias (AT y plomo) en sus acciones sobre la catalasa encefálica y sobre la actividad locomotora inducida por etanol. El AT restó potenciación al plomo sin llegar a bloquear dicha potenciación, sino sustrayéndole magnitud de manera dependiente a la dosis en ambas variables.

En relación a los efectos dependientes del AT, queremos destacar que los porcentajes de reducción observados tras la administración del AT son paralelos y muy similares en ambas variables: la deambulación inducida por etanol y la actividad de la catalasa. Es decir, aquellos grupos inyectados con solución salina (no con plomo) y con las dosis de AT 0 y 10 mg/kg redujeron su actividad en relación a los correspondientes grupos inyectados con plomo (100 mg/kg), en un 30% aproximadamente. El porcentaje de reducción aumentó con la dosis de 500 mg/kg de AT hasta un 35%. Esto parecía indicar que altas dosis de AT fueron menos eficaces en modular a la baja la potenciación producida por el plomo, tanto en actividad locomotora inducida por etanol como en actividad de la catalasa. En el caso de la interacción del AT con diferentes dosis de plomo se surgieron fenómenos muy parecidos: a medida que aumentaba la dosis de acetato de plomo, menos efecto reductor ejercía una dosis alta de AT.

El paralelismo encontrado en nuestro trabajo entre las acciones del AT y el plomo en la enzima catalasa por un lado y en la actividad locomotora inducida por etanol por otro, se ven reflejados en la alta correlación hallada entre ambas variables ( $r=0.99$ ,  $p<0.01$ ). Como ya hemos comentado anteriormente, ningún estudio precedente ha utilizado un inductor de la actividad de la catalasa ni ha tratado de correlacionar este efecto con alguna conducta, sin embargo, sí que podemos encontrar otro tipo de

correlaciones en diversos estudios acerca de la implicación de la catalasa en la ingesta de etanol (ARAGON y AMIT, 1992; ARAGON y cols., 1985b; AMIT y ARAGON, 1988). En estos trabajos la variable conductual dependiente fue la ingesta voluntaria de etanol. En el primer caso (ARAGON y AMIT, 1992) la ingesta de etanol en animales control o en animales tratados con diferentes dosis de AT correlacionó con la actividad de la catalasa cerebral en esos mismos animales ( $r=0.94$ ,  $p<0.05$ ). En los otros estudios los niveles plasmáticos de catalasa en animales no expuestos a etanol (AMIT y ARAGON, 1988) o la catalasa cerebral tras la administración voluntaria de este alcohol (ARAGON y cols., 1985b), correlacionó con la cantidad ingerida de etanol ( $r=0.82$ ,  $p<0.01$  y  $r=0.69$ ,  $p<0.05$  respectivamente).

En conjunto, los resultados demuestran una interacción entre el plomo y el AT en la actividad locomotora inducida por etanol y en la actividad de la catalasa encefálica. Ambos resultados van en dirección paralela y en general apoyan la hipótesis de una relación funcional entre ambas variables dependientes.



***FASE EXPERIMENTAL IV.***

***ADMINISTRACION CRONICA DE  
ACETATO DE PLOMO: EFECTOS EN LA  
ACTIVIDAD LOCOMOTORA INDUCIDA  
POR ETANOL Y EN LA ACTIVIDAD DE LA  
CATALASA.***

**IV**

## **Introducción.**

En las anteriores fases experimentales hemos explorado la capacidad del plomo para inducir la enzima cerebral catalasa y conjuntamente con ello, las repercusiones que esto tiene sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Si bien hallar y describir esta potenciación de la enzima es el principal propósito de la presente tesis, por los datos de la literatura revisados e incluso por trabajos piloto realizados en nuestro laboratorio, sabemos que el plomo también ejerce el efecto contrario sobre la catalasa: un efecto depresor.

Se ha demostrado que la exposición crónica a plomo, durante un periodo de ocho semanas, produce una apreciable acumulación de plomo en diferentes áreas cerebrales de ratas (SANDHIR y cols., 1994). Esta acumulación va acompañada por un incremento en la lipidoperoxidación y un decremento en la actividad de las enzimas antioxidantes como la SOD o la catalasa. El decremento de la actividad de la catalasa observado en dicho estudio puede ser atribuido a un descenso en la absorción del hierro, o debido a la inhibición de la biosíntesis del grupo hemo ya que el plomo ha demostrado interferir con ambos procesos. En otros estudios, la actividad de la catalasa en los eritrocitos de trabajadores expuestos al plomo en el lugar de trabajo, resultó significativamente menor que la de los sujetos controles (SUGAWARA y cols., 1991) y los niveles de lipidoperoxidación en los eritrocitos de estos trabajadores también resultó estar más elevada.

Por lo tanto, el plomo aplicado de una manera crónica, parece estar afectando la concentración de enzimas antioxidantes, con ello afecta a la eliminación de los radicales libres y así al daño que estos ejercen sobre los lípidos de membrana (CARDONA y LESSLER, 1974). A tenor de estos resultados, conocemos el efecto depresor que el plomo ejerce sobre la catalasa de diferentes tejidos.

En el aspecto conductual, son muchos los datos (descritos con mayor amplitud en la revisión precedente) que hablan de una interacción conductual entre exposición crónica a plomo y exposición crónica o aguda a etanol. Por ejemplo, ratas expuestas durante 61 días a fluidos o dietas que contenían acetato de plomo (500 ppm) y en las que el etanol fue administrado de manera aguda, mostraron una atenuación de la

hipoalgesia producida por el etanol (BURKEY y NATION, 1994), alteración de los efectos antipunitivos del etanol (NATION y cols., 1991b), atenuación de las propiedades depresoras que el etanol ejerce en un paradigma operante (GROVER y cols., 1993b) y atenuación de la agresión incitada por una descarga eléctrica, conducta que el etanol habitualmente induce (DAVIS y cols., 1993a).

Estas interacciones deben ser explicadas como alteraciones neuromoleculares producidas por el plomo que perturban los efectos normales del etanol, ya que en muchos de los anteriores trabajos no se encuentran diferencias en los niveles de etanol en sangre medidos hasta 6 horas después de la administración a diferentes dosis (BURKEY y NATION, 1994; NATION y cols., 1993).

En resumen, dado que la exposición crónica a plomo ha demostrado antagonizar alguna de las propiedades farmacológicas del etanol y en otros trabajos demuestra reducir la actividad de la catalasa, el presente conjunto de experimentos trata de relacionar ambos efectos utilizando la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de la catalasa encefálica en ratones, como variables principales del estudio.

Las hipótesis que esperábamos validar fueron:

1.- La administración crónica de acetato de sodio a una concentración de 500 ppm no debía afectar la actividad locomotora espontánea. Esta concentración no alteró otros parámetros conductuales en diferentes estirpes de roedores utilizadas en trabajos anteriormente revisados.

2.- La actividad locomotora inducida por etanol disminuiría en aquellos animales tratados crónicamente con acetato de plomo en relación a los animales control.

3.- La actividad de la enzima cerebral catalasa sería inhibida como consecuencia de la exposición crónica a este metal.

4.- Este régimen de tratamiento debería producir niveles incrementados de plomo en tejido cerebral, niveles mayores que los que se puedan adquirir espontáneamente del ambiente. Queríamos comprobar que se daba un depósito de plomo en el cerebro bajo nuestro régimen de tratamiento: dosis, vía de administración y tiempo tras la administración empleados. En el caso de existir, nuevamente, sería un dato a favor de que los efectos observados del plomo en interacción con el etanol sobre la actividad locomotora, se dan a nivel central. Asimismo, dado que se trataba un periodo

relativamente largo de exposición al metal, queríamos observar si la presencia del metal ocasionaba deterioro del tejido nervioso que pudiera afectar a su masa total.

5.- Los efectos del plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol y sobre la actividad de la enzima catalasa debían permanecer, al menos algún tiempo, después de haber sido retirado el tratamiento crónico con plomo. Esta hipótesis nos la planteamos como consecuencia de la premisa anterior. Si el plomo permanece acumulado en tejido cerebral durante largos periodos de tiempo, sus efectos sobre variables conductuales y bioquímicas perdurarían también cierto tiempo después de que no existiera un ingreso de plomo en el organismo.

6.- Esperábamos que la concentración de plomo no resultaría tóxica en la estirpe de ratones utilizada en nuestros trabajos, al menos en las variables fisiológicas que íbamos a considerar: la evolución del peso corporal y cerebral. En el caso del peso corporal, nuestro interés era comprobar si el tratamiento estaba afectando dicha variable fisiológica, no sólo porque un deterioro en el peso supone un efecto tóxico que puede interferir en la conducta deambulatoria del animal, sino porque además en el tratamiento crónico la vía a través de la cual éste es administrado es oral; es el único fluido disponible. Si los animales tratados con esta concentración de acetato de plomo vieran disminuido su peso a lo largo de los días, quizá nos encontraríamos ante un fenómeno de aversión al sabor de la dilución y a una menor ingesta de fluido como consecuencia. Es conocido que los roedores decrecen la ingesta de alimentos sólidos si no disponen de fluidos, con lo cual tendríamos animales desnutridos. Pero sobre todo, un descenso en el peso, podría indicar que el animal no ingresaba la proporción diaria de plomo que nosotros estimamos en un principio y por lo tanto, que el tratamiento no se aplicaba de manera adecuada.

7.- Como en el caso de los experimentos agudos, consideramos importante verificar que las modificaciones conductuales que se produjeran en los grupos tratados con plomo e inyectados con etanol, no se debían a diferencias en la farmacocinética del etanol producidas por interferencias del plomo sobre el metabolismo periférico de la droga.

## **Materiales y métodos.**

En la presente fase experimental, al igual que en las anteriores se realizaron tanto estudios conductuales; actividad locomotora espontánea o inducida por etanol, como estudios bioquímicos y fisiológicos. Las variables bioquímicas y fisiológicas que evaluamos fueron: actividad de la catalasa encefálica, acumulación de plomo en cerebro, evolución del peso corporal, del cerebro y concentración de etanol en sangre.

### **I. Estudios Conductuales.**

**Sujetos y Condiciones de Alojamiento.** Los animales y las condiciones de alojamiento de los mismos desde su llegada hasta el inicio de la fase experimental fueron iguales a las ya descritas en el apartado correspondiente de la fase experimental I.

**Drogas.** Las sustancias empleadas en los tratamientos aplicados a los sujetos experimentales fueron las siguientes:

- Acetato de Plomo (Panreac Química S.L.). Se preparó una disolución con agua destilada y acetato de plomo a una concentración de 500 ppm (583 mg en 1000 ml).

- Acetato de Sodio (Sigma Aldrich, S.A.). Como control de la administración crónica del plomo, a un grupo de animales se le suministró como fluido, una disolución con agua destilada y acetato de sodio a una concentración de 500 ppm (500 mg en 1000 ml).

- Solución Salina. Se preparó una solución de cloruro sódico (Panreac Química S.A.) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.9%. La vía de administración fue la inyección intraperitoneal (IP).

- Etanol. Se preparó una solución de alcohol etílico de 96° (Panreac Química S.A.) al 20% v/v (21 ml en 100 ml de agua destilada). Las diferentes dosis empleadas fueron siempre tomadas de esta solución estándar. La vía de administración elegida para esta droga fue la inyección intraperitoneal (IP).

- Ketamina. Se preparó una solución de ketamina (5 g en 10 ml) a partir de un preparado comercial (Imalgene, Rhone Merieux Labs.) del cual se tomaron 0.6 ml, que

se disolvieron en 5.4 ml de agua destilada. Con este producto se anestesió a los ratones antes de ser sacrificados para la toma de muestras de tejido. La vía de administración para esta sustancia fue la inyección intraperitoneal (IP).

**Aparataje.** La actividad locomotora fue medida en el "Campo Abierto" consistente en un cilindro de cristal transparente cuyas medidas eran 25 cm de diámetro por 30 cm de altura. En toda esta fase la actividad locomotora se registró de manera automatizada con el sistema SMART anteriormente descrito. Dicho sistema registra el desplazamiento del animal en el mismo campo abierto utilizado en los experimentos precedentes, contabilizando los centímetros totales realizados por el animal.

**Procedimiento.** Transcurrida una semana de aclimatación al estabulario, los ratones se dividieron en dos grupos de igual número y se sometieron a las condiciones experimentales. El agua que había servido como fluido era sustituida por una solución de acetato de plomo (grupo experimental) o de acetato de sodio (grupo control) que permaneció como único fluido disponible mientras duraba la fase experimental. El día de inicio del tratamiento con plomo o con sodio, los animales tenían 5 semanas de edad y su peso promedio era de  $32 \pm 3$  gramos.

Para todas las pruebas que realizamos con administración crónica de acetato de plomo, elegimos una concentración de este metal disuelto en la bebida que en la literatura había demostrado no ser deletérea (NATION y cols., 1982, 1986, 1991a; DAVIS y cols., 1993a,b). La concentración elegida fue 500 ppm de acetato de plomo o acetato de sodio en agua destilada administrados por vía oral. Utilizamos el acetato de sodio como control para tener la certeza de que no es el acetato *per se* la molécula responsable de los cambios que puedan aparecer en la variable dependiente. Esta sustancia ha sido utilizada como control en muchos de los experimentos conductuales mencionados previamente (NATION y cols., 1982, 1986, 1991a; DAVIS y cols., 1993a,b). Además, el acetato de sodio permitiría igualar las propiedades gustativas de ambos fluidos y conseguir que si los animales, al principio, rechazaran los fluidos por sus propiedades gustativas, este fenómeno fuera parejo en ambos grupos.

En el primer experimento, todos los animales recibieron un tratamiento (acetato de plomo o acetato de sodio) y tras un tiempo fijado por el experimentador (0, 15, 30 ó 60 días) fueron expuestos al campo abierto. En él se registró la actividad locomotora espontánea (ratones que no recibían ninguna dosis de alcohol) o la actividad locomotora inducida por una dosis de alcohol (2.5 g/kg). El periodo máximo de tratamiento también

lo obtuvimos de los trabajos ya existentes (60 días) a fin de poder compararlos con nuestros datos (NATION y cols., 1982, 1986, 1991a; DAVIS y cols., 1993a,b).

El día del test los animales fueron trasladados a la sala de conducta donde eran pesados individualmente y posteriormente sometidos a las condiciones experimentales del paradigma conductual. Los registros de actividad conductual se tomaron en una sala con luz indirecta suave y donde el ruido externo fue atenuado. En dicha sala, la temperatura se mantuvo en los mismos valores que la del estabulario,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La evaluación conductual se realizó entre las horas 2 y 5 del periodo luminoso del ciclo circadiano de los animales.

Inmediatamente antes del registro de la actividad locomotora, los animales eran inyectados con etanol o con una dosis equivalente de solución salina y eran introducidos en el campo abierto donde se registraba la actividad locomotora medida en centímetros. La dosis de etanol empleada (2.5 g/kg) fue elegida por ser la dosis que, en trabajos previos de nuestro laboratorio, demostró provocar la máxima inducción de actividad locomotora en la estirpe de ratones Swiss. Las sesiones de medición de la actividad locomotora comprendían un total de veinte minutos medidos inmediatamente después de la administración (IP) de la correspondiente dosis de etanol. Tras la inyección, cada animal era introducido individualmente en el campo abierto donde permanecía durante un periodo de 20 minutos. Los primeros 10 minutos fueron desechados del computo final para reducir el efecto de variables contaminantes (manipulación, novedad, absorción de las drogas, etc.) (KELLEY, 1993; DUDEK y TRITTO, 1994). La medición de la actividad locomotora se realizó durante los últimos diez minutos.

En el segundo experimento se trataba de observar cual era la duración de los efectos observados en la prueba anterior, una vez el tratamiento con plomo ha sido retirado. Tratamos de ver si existe reversibilidad en los cambios que el plomo administrado durante intervalos largos, tiene en la actividad locomotora inducida por etanol. Para ello un grupo diferente de animales fue puesto en tratamiento durante 60 días. En este periodo, el grupo experimental dispuso de un fluido que consistía en la exposición crónica a acetato de plomo a 500 ppm disuelto en agua destilada. El grupo de sodio (considerado control), disponía de un preparado de acetato de sodio a la misma concentración. A los 60 días del comienzo del tratamiento, dichas disoluciones fueron retiradas y sustituidas por agua corriente. El tiempo que permanecieron con agua como fluido constituyó el periodo de postratamiento. Los animales permanecieron en este nuevo régimen durante periodos diferentes: 0, 20 ó 40 días, tras los cuales fueron

inyectados (IP) con etanol (2.5 g/kg) y se evaluó su actividad locomotora inducida en campo abierto.

En este estudio realizamos también un seguimiento del peso de dos grupos de animales tratados con acetato de plomo o acetato de sodio (500 ppm) durante un periodo de 60 días, tras los cuales dichos tratamientos fueron retirados y sustituidos por agua corriente. En el inicio del tratamiento ambos grupos de animales contaban con un peso promedio de 25 gramos. aproximadamente y su edad era de 5 semanas. El peso de cada animal se registró en 11 ocasiones a lo largo del periodo de tratamiento y 2 veces en el periodo de postratamiento.

## **II. Estudios Bioquímicos.**

Las variables dependientes registradas fueron los niveles de actividad catalítica de la enzima cerebral catalasa, los niveles de etanol en sangre y la acumulación de plomo en cerebro. El tratamiento de la muestra, los productos químicos utilizados, el aparataje y el procedimiento fueron los mismos que los descritos en el apartado de estudios bioquímicos de la fase experimental I.

**Niveles de actividad de la enzima cerebral catalasa.** Estos niveles han sido registrados para dos condiciones experimentales: Animales tratados durante 60 días con acetato de plomo o de sodio (500 ppm) y animales 40 días después de que se les retirara ese tratamiento. Los animales fueron divididos en 4 grupos y sometidos a tratamiento durante 60 días con acetato de sodio o plomo (500 ppm). A los 60 días dos de los grupos (uno de sodio y otro de plomo fueron sacrificados tras la perfusión y el cerebro extraído para la medición de la actividad de la catalasa (grupo 0 días de postratamiento). A los otros dos grupos se les retiró el tratamiento que fue sustituido por agua corriente. Estos animales permanecieron en estas condiciones durante 40 días (grupo 40 días de postratamiento).

**Niveles de etanol en plasma.** Las mediciones se realizaron 15 ó 30 minutos después de la inyección de etanol. En este caso, la latencia entre la administración de etanol y la medición de sus niveles en sangre fue elegida teniendo en cuenta sólo intervalos temporales próximos a los utilizados para el registro de la actividad locomotora inducida por etanol (15 y 30 minutos). Elegimos la misma dosis de acetato de plomo (500 ppm) que en el resto de experimentos de la presente fase experimental y



la misma dosis de etanol que en los experimentos de actividad locomotora inducida por etanol (2.5 g/kg).

### **III. Análisis Estadísticos.**

Todos los datos fueron analizados utilizando pruebas estadísticas paramétricas. En todos los experimentos de la presente fase se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) donde las variables fueron entre sujetos en todas las pruebas menos aquellas en las que se evaluó la evolución del peso corporal a lo largo de diferentes días. En esa prueba se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para la variable peso. En los casos en los que se consideró necesario se aplicó un análisis *post hoc* de la interacción de los factores principales, para ver las diferencias entre grupos. Dicha prueba fue Fisher's Least Significant Difference Tests (LSD).

Para aquellas pruebas en las que sólo se comparaba la diferencia entre dos grupos, se aplicó el test T de Student de contrastes entre medias.

El programa estadístico utilizado fue STATISTICA 4.1. para MAC.

Las tablas con los resultados de cada análisis aparecen en el apartado de Apéndices.

## Resultados.

### 4.1. Efecto del tratamiento crónico sobre la actividad locomotora.

Un ANOVA de tres factores: Tratamiento (AcNa / AcPb) x dosis de etanol (0.0 / 2.5 g/kg) x días de exposición (0/ 15/ 30/ 60 días) reveló un efecto significativo para el factor dosis de etanol,  $F(1,144)=65.2$ ,  $p<0.01$ , el factor tratamiento  $F(1,144)=6.3$ ,  $p<0.01$  y para la interacción entre ambos factores (tratamiento x dosis de etanol  $F(1,144)=5.5$ ,  $p<0.05$ ). El factor días de exposición y el resto de interacciones no fueron significativas. Estos resultados confirman el efecto dependiente de la dosis de etanol en la actividad locomotora.

Realizamos una prueba *post hoc* LSD-Fisher sobre la interacción tratamiento x dosis de etanol x días de exposición y encontramos que en los días 30 y 60 los grupos inyectados con etanol 2.5 g/kg y tratados con plomo son significativamente diferentes de los grupos inyectados con etanol 2.5 g/kg y tratados con acetato de sodio ( $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente). También se encontró una significación residual ( $p<0.06$ , que no viene señalada en la figura) en el día 15 de tratamiento entre los grupos sodio/etanol y plomo/etanol.

Así pues, el plomo redujo la actividad locomotora inducida por etanol presumiblemente desde los 15 días de tratamiento, sin embargo, su mayor efecto apareció a los 60 días de tratamiento.

También pudimos comprobar mediante la prueba *post hoc* que la administración crónica de esta concentración de acetato de plomo no tiene ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea (grupos 0.0 g/kg de etanol) de los animales, ya que en ningún día hubo diferencias entre el grupo tratado con sodio y el tratado con plomo. Tampoco el acetato de los compuestos afectó dicha actividad ya que, en ningún periodo (15, 30 ó 60 días), los grupos salina fueron diferentes del día 0. Otro control necesario era comprobar que el etanol inducía la actividad locomotora. Efectivamente, en cada intervalo de tratamiento el grupo sodio/etanol fue significativamente diferente del grupo sodio/salina para su mismo día ( $p<0.01$ ).

El resultado más importante fue, por lo tanto, que el acetato de plomo administrado crónicamente tuvo un efecto depresor sobre la actividad locomotora

inducida por etanol, sin que ello afectara a la deambulaci3n espont3nea de los animales. Este efecto fue significativo a partir de los 30 d3as.

En la figura N3 4.1. se presenta el efecto del tratamiento cr3nico.

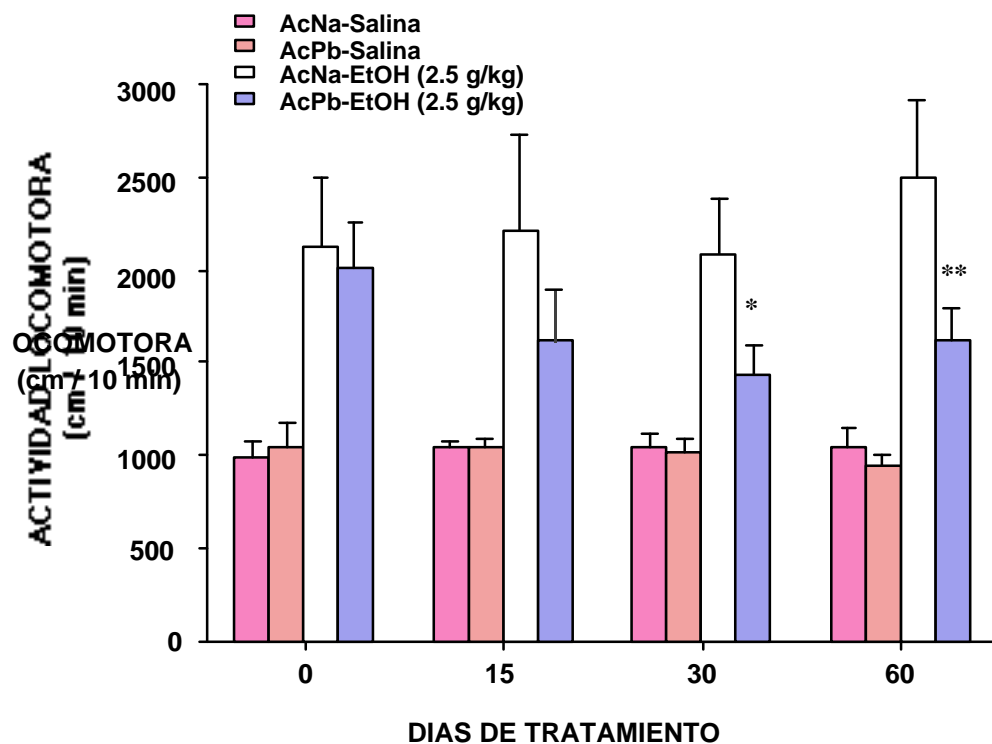


FIGURA N3 4.1.: Efecto de la exposici3n cr3nica a acetato de plomo sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Media  $\pm$  EMS de la actividad locomotora en campo abierto (cent3metros recorridos en 10 minutos). Los ratones fueron expuestos a fluidos que conten3an 500 ppm de acetato de sodio (AcNa) o de acetato de plomo (AcPb) durante 0, 15, 30 3 60 d3as, tras los cuales fue medida la actividad locomotora espont3nea (grupo salina) o inducida por etanol (2.5 g/kg) (n=10 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 grupo AcPb /EtOH significativamente diferente del grupo AcNa /EtOH en el correspondiente d3a de tratamiento).

#### 4.2. Retirada del tratamiento con acetato de plomo.

Realizamos un ANOVA de dos factores: Pretratamiento (AcNa / AcPb) x D3as de postratamiento (0/ 20/ 40 d3as) que revel3 un efecto significativo para el factor pretratamiento ( $F(1, 48)=12.2$ ,  $p<0.01$ ). Nuevamente, esto indicaba que el plomo administrado durante 60 d3as afectaba la actividad locomotora inducida por etanol, incluso tiempo despu3s de no ser administrado. El factor d3as de postratamiento no fue significativo ni tampoco lo fue la interacci3n.

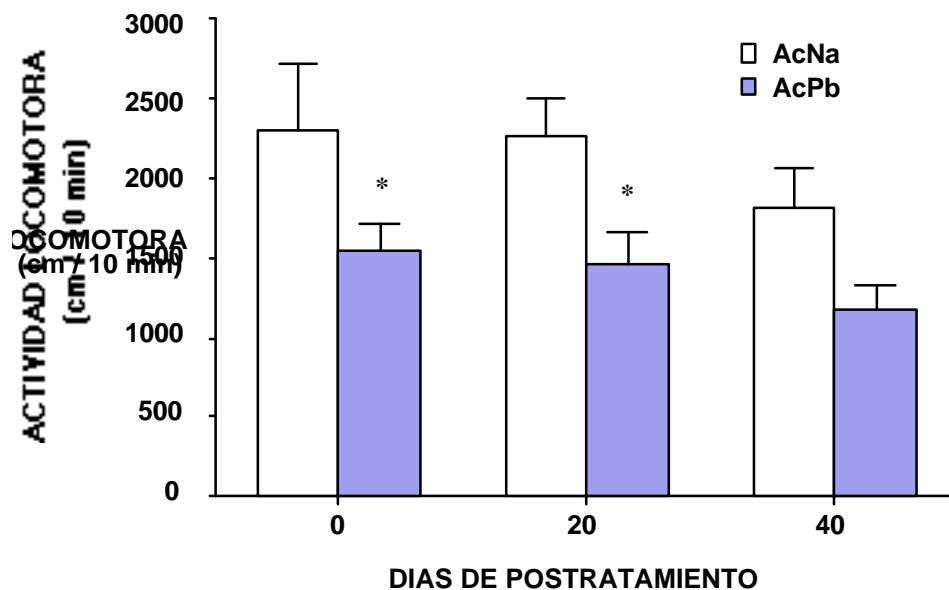


FIGURA N° 4.2.: Efecto de una dosis de etanol (2.5 g/kg, IP) sobre animales preexpuestos durante 60 días a fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (AcNa) o de acetato de plomo (AcPb) seguidos por un periodo de 20 ó 40 días sin tratamiento. En el día 0 los tratamientos fueron retirados. Media + EMS de la actividad locomotora inducida por etanol en campo abierto (n=9 por grupo). (\* $p < 0.05$ , grupo AcPb significativamente diferente del grupo AcNa en el correspondiente día de tratamiento).

Para saber si existían diferencias significativas entre el grupo de plomo y el de sodio para cada día realizamos una prueba *post hoc* LSD-Fisher y encontramos que en los días 0 y 20 los grupos tratados con plomo eran significativamente diferentes de los grupos tratados con acetato de sodio ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la diferencia entre los grupos tratados con sodio y con plomo a los 40 días de haber eliminado el tratamiento no resultó estadísticamente significativa.

Esto indicaba que el efecto depresor del plomo sobre la actividad locomotora inducida por una dosis de etanol (2.5 g/kg) podría ir reduciéndose con el paso del tiempo una vez ha sido retirado.

#### 4.3. Actividad de la enzima cerebral catalasa.

Los niveles de actividad peroxidática de la catalasa aparecen en la tabla N° 4.3.

TABLA 4.3.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ACETATO DE PLOMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA ENCEFALICA

DIAS DE RETIRADA	PRETRATAMIENTO (500 ppm)	
	AcNa	AcPb
0	1.77 ± 0.09	0.97 ± 0.19**
40	1.63 ± 0.07	1.30 ± 0.08

Media ± EMS de la actividad de la catalasa encefálica (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min / mg proteína). Los animales fueron expuestos durante 60 días a fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (AcNa) o acetato de plomo (AcPb). Tras este periodo, las soluciones fueron retiradas y los sujetos fueron sacrificados inmediatamente tras la retirada (día 0) o a los 40 días (n=6 por grupo). (\*\*p<0.01 grupo AcPb significativamente diferente del grupo AcNa en el correspondiente día).

Un ANOVA de dos factores: Tratamiento (AcNa / AcPb) x días de postratamiento (0 / 40) dio como significativo el factor tratamiento (F(1,20)=20.2, p<0.01). Ni el factor días ni la interacción resultaron ser significativos.

El test LSD demostró que el acetato de plomo redujo la actividad de la catalasa encefálica tras 60 días de tratamiento (p<0.01), grupo que en este caso habíamos considerado 0 días de retirada. Sin embargo, dichas diferencias ya no resultaron ser significativas tras 40 días de retirada de las disoluciones, lo cual parecía indicar que el efecto depresor del plomo sobre la actividad de esta enzima revirtió con el tiempo una vez que el ingreso del metal en el organismo se había detenido.

#### 4.4. Evolución del peso corporal.

Los resultados del ANOVA de medidas repetidas con una variable intrasujetos (días) y otra variable entresujetos (tratamiento) mostraron que sólo el factor días fue significativo ( $F(12,72)=132.1, p<0.01$ ). Estos resultados indicaban que la evolución del peso de ambos grupos a través de los días de tratamiento no era diferente y que los animales ganaron peso a lo largo de la fase de tratamiento independientemente de cual fuera éste.

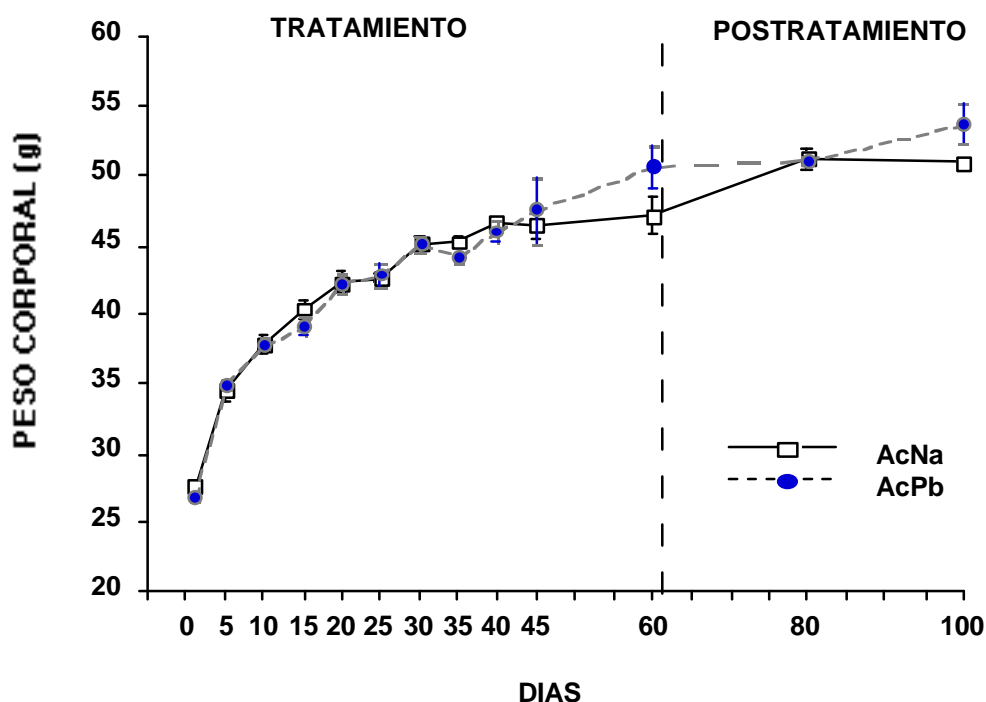


FIGURA N° 4.4.: Evolución del peso corporal de ratones expuestos durante 60 días a fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (AcNa) o de acetato de plomo (AcPb) a los que posteriormente se les retiró el tratamiento durante 40 días. Media  $\pm$  EMS del peso corporal (gramos) para cada grupo y día ( $n=4$  por grupo).

Concluimos que en estos animales y con esta concentración de acetato de plomo, el metal no ejerció un efecto deletéreo sobre la ganancia del peso corporal ni durante el tratamiento ni cuando éste fue retirado.

#### 4.5. Acumulación de plomo en cerebro y peso del cerebro.

En el presente experimento analizamos los niveles de plomo acumulados en tejido cerebral de ratones sometidos a un tratamiento crónico igual al utilizado en las pruebas

conductuales: 60 días con fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio para el grupo control y 500 ppm de acetato de plomo para el grupo experimental.

En la tabla 4.5. se muestran los niveles de plomo en cerebro de ratones tratados con acetato de plomo o de sodio y los pesos totales de los cerebros tras dicho periodo de tratamiento. Para cada medición de la acumulación de plomo se realizó una homogeneización de los cerebros que constituían el grupo de tratamiento.

Los datos de acumulación de plomo analizados mediante una prueba T de Student (contraste de medias) dieron un efecto significativo del tratamiento ( $t_3=4.2$ ,  $p<0.05$ ). Los animales tratados con plomo demostraron tener una mayor acumulación del metal en tejido nervioso que el grupo tratado con sodio.

En cuanto al peso del total del cerebro húmedo, los resultados del análisis mostraron que no existían diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento. Esto indicó que la concentración y el periodo de administración de plomo no suponían un deterioro general en la evolución del cerebro, al menos en la variable registrada.

TABLA 4.5.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRONICO CON ACETATO DE PLOMO SOBRE EL PESO TOTAL Y LA ACUMULACION DE PLOMO EN CEREBRO

TRATAMIENTO (500 ppm)	ACUMULACION DE PLOMO ( $\mu\text{g/g}$ )	PESO CEREBRAL (mg)
AcNa	$0.604 \pm 0.1$	$468.2 \pm 5.4$
AcPb	$2.859 \pm 0.3^*$	$467.4 \pm 5.9$

Media  $\pm$  EMS de la acumulación de plomo detectada en cerebro y del peso del mismo en ratones tratados crónicamente con fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (AcNa) o de acetato de plomo (AcPb) durante 60 días (n= 4-5 por grupo). (\* $p<0.05$  grupo AcPb significativamente diferente del grupo AcNa),

#### 4.6. Niveles de etanol en plasma sanguíneo.

Analizamos los datos con un ANOVA de dos factores: Tiempo de medición (15 / 30 min) x tratamiento (AcNa / AcPb). El factor tiempo resultó no ser significativo y tampoco lo fueron el factor pretratamiento ni la interacción entre el pretratamiento y el tiempo.

El hecho de que la variable tiempo no diera diferencias significativas, contrasta con el dato obtenido en los estudios de administración aguda, donde a los 30 minutos aparecieron ya niveles menores de etanol en sangre. Quizá esta diferencia estaba indicando un metabolismo más lento en los animales más viejos.

Estos resultados aparecen en la tabla N° 4.6.

TABLA 4.6.

EFECTO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE ACETATO DE PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE ETANOL EN SANGRE (mg/dl)

TIEMPO (minutos)	TRATAMIENTO (500 ppm)	
	AcNa	AcPb
15	319.5 ± 19.8	305.6 ± 11.7
30	288.9 ± 19.0	290.9 ± 11.1

Media ± EMS de etanol en sangre (mg/dl) tras una administración aguda IP de 2.5 g/kg de etanol en animales tratados crónicamente (60 días) con 500 ppm de acetato de plomo (AcPb) o de acetato de sodio (AcNa). La sangre troncal fue recogida 15 ó 30 minutos después de la administración de etanol (n=4 por grupo).



## **Discusión de los resultados.**

Los resultados del presente estudio revelaron una interacción antagónica entre la exposición crónica a plomo y la actividad locomotora inducida por etanol en ratones. Los ratones expuestos a plomo e inyectados con etanol (2.5 g/kg) demostraron una atenuación de la actividad locomotora inducida por etanol en relación a los controles. Esta reducción fue mayor a medida que aumentaba el tiempo de exposición al metal: aunque a los 15 días el efecto ya parecía manifestarse, no fue hasta los 30 días cuando las diferencias entre el grupo control y el experimental se hicieron estadísticamente significativas. El día 15 la reducción fue del 26%, el día 30 del 31% y la máxima reducción de la actividad locomotora fue del 35% en relación a los controles y se obtuvo a los 60 días. Estos datos se encuentran en sintonía con muchos otros presentes en la literatura (NATION y cols., 1991a,b; 1993; GROVER y cols., 1993a,b; BURKEY y NATION, 1994; DAVIS y cols., 1993a,b,c) que informan de interacciones antagónicas entre plomo administrado crónicamente y etanol en diferentes paradigmas conductuales, sugiriendo con ello un impacto farmacológico disminuido del etanol entre los animales tratados con plomo.

En nuestro estudio el efecto depresor del plomo en interacción con el etanol se mantuvo tras 20 días desde la retirada del metal, aunque a los 40 días las medias en actividad locomotora entre ambos grupos ya no resultaron estadísticamente diferentes demostrando así una tendencia a la recuperación. Esta leve tendencia a la recuperación es un dato un tanto confuso si nos atenemos al porcentaje de reducción del plomo en relación al grupo control; el porcentaje se mantuvo en el 35% al igual que ocurría tras 60 días de tratamiento. Fijándonos en las medias de actividad locomotora de los grupos control observamos un decremento en los centímetros recorridos por los animales a medida que aumentan los días de retirada del tratamiento. Una posible explicación a este fenómeno es la edad de los animales. Los animales contaban con casi 150 días de edad en el momento del último registro conductual y por lo tanto diferían notablemente de la edad de animales evaluados en otros intervalos temporales.

Por otro lado, posibles efectos deletéreos de la administración de plomo parecen no ser la causa de los resultados conductuales hallados. En la presente serie de experimentos no apareció un efecto dañino del plomo en las variables conductuales y fisiológicas medidas en la cepa de ratones Swiss, ya que la exposición al plomo no tuvo ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea, tampoco disminuyó el peso corporal de los ratones ni el peso de su cerebro. En las pruebas sobre la evolución del

peso realizadas con administración crónica de plomo, los ratones no sufrieron alteración en relación a un grupo control a lo largo de 100 días. Esto mismo lo observamos en trabajos realizados por otros autores que utilizaron la misma concentración y periodos similares de exposición que nosotros (entre 50 y 75 días) en ratas adultas Sprague-Dawley (NATION y cols., 1991a,b, 1993; GROVER y cols., 1993a,b,; BURKEY y NATION, 1994) y en ratas genéticamente seleccionadas MRC (FLORA y TANDOM, 1987).

Consideramos importante la realización de todos estos controles de la toxicidad ya que, la modificación de estos parámetros ha sido observada por diversos autores (BOOZE y MACTUTUS, 1990; CORY-SLECHTA y POKORA, 1991). Sin embargo, queremos resaltar que nuestros datos partían de situaciones experimentales diferentes. El propósito de los mencionados trabajos fue investigar los efectos neurotóxicos del plomo en el desarrollo evolutivo normal de roedores. En sus experimentos, la exposición al plomo comenzó en periodos tempranos de desarrollo (entre 3 y 21 días). En todos los trabajos de la presente tesis el plomo no se administró a animales más jóvenes de 42 días, momento en que, presumiblemente, la vulnerabilidad al tóxico también es menor (tenían 5 semanas de edad cuando llegaban a nuestro estabulario y disponían de una semana de adaptación antes de ser sometidos al tratamiento crónico con plomo).

Por otro lado, ninguna diferencia en actividad locomotora inducida por etanol entre ambos grupos de ratones (sodio o plomo) puede ser atribuida a niveles diferenciales de etanol en sangre ya que no encontramos diferencias entre grupos a la dosis y tiempos evaluados, tras la administración de etanol. También encontramos resultados que apoyan los obtenidos por nosotros en la literatura (BURKEY y NATION, 1994; NATION y cols., 1993). Más importantes todavía son los datos que indican que el acetato de plomo administrado oralmente y durante ocho semanas, no afecta a las enzimas hepáticas ADH ni ALDH (FLORA, y TANDOM, 1987). Así, la falta de efectos del plomo sobre el metabolismo periférico del etanol sugiere un lugar central para la interacción plomo-etanol. Queremos resaltar también, en relación a los datos obtenidos de los análisis de etanol en sangre, que la no existencia de diferencias entre 15 y 30 minutos sugiere una desaparición más lenta del etanol en animales más viejos. Este dato bioquímico apoya el resultado obtenido en actividad locomotora a los 60 días, donde todos los animales inyectados con etanol (grupo sodio y grupo plomo) tuvieron unas medias de actividad, que si bien no fueron significativamente diferentes del resto, si resultaron ser más elevadas que en los días precedentes (0, 15 ó 30).

El régimen de tratamiento utilizado en este estudio fue eficaz, ya que produjo una concentración significativa de plomo en el cerebro de los ratones. Nuestros datos, así como otros análisis de acumulación de plomo en diferentes tejidos de roedores: sangre (NATION y cols., 1991a,b; GROVER y cols., 1993a,b), hígado y cerebro (SANDHIR y cols., 1994; FLORA y TANDOM, 1987) llevados a cabo por diferentes autores, indican que la vía oral en la administración del plomo consigue altas concentraciones de este metal. Esta acumulación ha sido propuesta como la causante de la disminución de algunas enzimas antioxidantes y con ello de un aumento en la lipidoperoxidación (SANDHIR y cols., 1994).

En cuanto a la actividad de la catalasa cerebral, ésta se redujo significativamente (40%) en el grupo tratado con plomo durante 60 días (0 días de retirada) en relación al grupo control. También mostró una reducción, aunque no significativa a los 40 días de la retirada del plomo. Los datos obtenidos en los niveles de catalasa están en la misma línea que estudios previos (SANDHIR y cols., 1994; SUGAWARA y cols., 1991). La recuperación en la actividad de la catalasa parece progresiva, ya que, si bien no es estadísticamente significativa la diferencia entre el grupo tratado con plomo y el control, todavía persisten diferencias en las medias. Esto sería explicable si tenemos en cuenta estudios previos (HAYAKAWA, 1971) acerca de la vida media de algunos metabolitos del plomo en tejido nervioso. En dichos trabajos los metabolitos de plomo permanecieron intactos por un periodo superior a 40 días.

En resumen, los resultados aquí presentados evidencian la idea de que el plomo administrado crónicamente tiene efectos muy diferentes sobre la actividad de la catalasa cerebral así como en deambulación inducida por etanol, que el mismo metal administrado de manera aguda y por otra vía. En concreto, los resultados han sido opuestos en ambos tipos de variables.

***FASE EXPERIMENTAL V.***

***MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA  
CATALASA Y EFECTO EN LA NARCOSIS  
INDUCIDA POR ETANOL.***

V

## **Introducción.**

En anteriores apartados hemos mencionado que los efectos inducidos por etanol pueden clasificarse según una distribución bifásica, hablándose de efectos inductores (o excitatorios) y depresores (también llamados inhibitorios). Esta división depende tanto de las dosis de etanol utilizadas como del tiempo desde la administración de éste y también de la especie a la que pertenezcan los sujetos experimentales (POHORECKY, 1977).

La inducción de pérdida del reflejo de enderezamiento (también conocido como narcosis) ha sido un test conductual utilizado desde hace varias décadas con diferentes manipulaciones farmacológicas y genéticas. Tanto la latencia como la duración de la narcosis son paradigmas conductuales que sólo se utilizan en el estudio de drogas narcóticas como el etanol. Este estado narcótico no es estrictamente un estado de sueño (por ello cada vez se utiliza menos el término inglés de "*sleep time*"), sino de pérdida de las capacidades conscientes, y se observa tanto en animales como en seres humanos. Se evalúa como el tiempo durante el cual el animal pierde la capacidad para mantenerse sobre las cuatro patas.

Al igual que ocurre con la actividad locomotora, la duración de la narcosis es potenciada en aquellos animales en un periodo evolutivo más avanzado (LITTLE y cols., 1996). Los animales más viejos son más sensibles a los efectos depresores del etanol, por ello al realizar comparaciones siempre se debe tener en cuenta la edad de los sujetos en el momento en que es evaluada la narcosis.

Algunos autores han propuesto como mecanismo explicativo de las diferencias entre estirpes en esta conducta, a las diferencias en la absorción del etanol en la sangre y la eliminación debida al metabolismo hepático (CANJANOVICH y MACLNNES, 1973). Así pues, en el caso de las estirpes consanguíneas DBA/2J y C57BL/6J una mayor duración de la narcosis y una menor latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento se corresponden con unos niveles de etanol en sangre menores (en los primeros en relación a los segundos). Estas observaciones acerca de una reducción de etanol en sangre contrastan con el hecho de que los animales DBA tienen menores niveles de alcohol deshidrogenasa y de aldehído deshidrogenasa en general, por lo que

se esperaría un metabolismo hepático del etanol enlentecido en estos ratones y con ello una mayor sensibilidad a los efectos narcóticos de una dosis aguda de etanol (CANJANOVICH y MACLNNES, 1973).

Asimismo, otros equipos de investigadores se han centrado en el papel del acetato, y consecuentemente de la adenosina, formados endógenamente a partir del metabolismo periférico del etanol, como elementos implicados en algunos de los efectos depresores producidos por el etanol: entre ellos la depresión de la actividad locomotora, la incoordinación motora (ISRAEL y cols., 1994) y la duración de la narcosis (PROCTOR y DUNWIDDIE, 1984; DUDEK y PHILLIPS, 1983). Estos últimos autores investigan los efectos de agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina en dos subestirpes de ratones con distinta sensibilidad a los efectos hipnóticos del etanol: LS (*long sleep*) y SS (*short sleep*) (DUDEK y PHILLIPS, 1983). Estos animales presentan pocas diferencias en la concentración de varios tipos de neurotransmisores, en el número de receptores y en otros diferentes índices neuroquímicos (PROCTOR y DUNWIDDIE, 1984), sin embargo, manifiestan drásticas disimilitudes en relación tanto a los efectos del etanol como a los agonistas de los receptores de adenosina en parámetros como la hipotermia (donde los LS presentan una mayor reducción de la temperatura corporal) y los intentos de escape en situaciones de estrés moderado (donde los LS responden en menor medida). A partir de estos datos Israel y cols. (1994) proponen que la adenosina formada centralmente a partir del acetato, juega un papel esencial en las acciones depresoras del etanol.

Otros autores buscan los mecanismos de la narcosis en el metabolismo central del etanol. Tal y como se ha presentado en la introducción general, una propuesta teórica acerca de los mecanismos de acción del etanol, es la posibilidad de que diferentes elementos de la cadena metabólica de éste den cuenta de sus diferentes efectos fisiológicos y comportamentales. En este sentido, la posibilidad de que el acetaldehído afecte de forma selectiva los efectos inductores del etanol, sin alterar otras respuestas como la hipotermia o la coordinación motora ha sido propuesta anteriormente (ARAGON y AMIT, 1985). Sin embargo, otros estudios demuestran la posible implicación del acetaldehído en la pérdida del reflejo de enderezamiento (DUDEK y FULLER, 1978; TRUITT y WALSH, 1971), ya que su administración periférica es más eficaz que el propio etanol en la producción de narcosis, aunque para ello se necesitan dosis tan altas de acetaldehído que se alejan de las detectadas en la sangre tras una administración de etanol a dosis narcóticas.

Entre los estudios acerca del mecanismo central de acción del etanol sobre la narcosis, se incluyen trabajos que se valen de las manipulaciones de la catalasa (TAMPIER y cols. 1988; ARAGON y cols., 1991c,d; ARAGON y AMIT, 1993). En ellos los resultados han sido más inciertos que los obtenidos en la actividad locomotora, ya que dichas manipulaciones apuntan en diferentes direcciones. Esta incertidumbre en las conclusiones viene dada, entre otras razones, por la utilización de dos especies diferentes de roedores: ratas y ratones. Es conocido que estas especies se comportan de manera opuesta en relación a los efectos del etanol en actividad locomotora, por ejemplo las ratas sistemáticamente experimentan una disminución (creciente con la dosis) de la actividad locomotora ante la administración aguda de etanol y los ratones siguen la anteriormente descrita curva bifásica (POHORECKY, 1977).

En relación a las manipulaciones de la catalasa sobre la narcosis inducida por etanol, la herramienta más utilizada ha sido el AT (TAMPIER y cols., 1988; ARAGON y cols., 1991c,d). Estos estudios utilizan diferentes estirpes de ratas: consanguíneas (UCh) y heterogéneas (Long Evans) y el resultado en ambos casos es la disminución de la narcosis a la vez que una mayor latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento en aquellas ratas inyectadas con AT. Es decir, menos actividad de la catalasa supone menos tiempo de narcosis. Estos datos abogan por la implicación de la catalasa y por tanto del acetaldehído en la sensibilidad a los efectos depresores de altas dosis de etanol. Junto a esto, un efecto demostrado, en estos mismos trabajos, es la elevación de los niveles de etanol en sangre en aquellos animales inyectados con AT y dosis hipnóticas de etanol (TAMPIER y cols., 1988), efecto que no es detectado cuando las dosis de etanol son menores (SMITH y cols., 1997).

Otro tipo de antecedentes sobre el tema que relacionan catalasa con pérdida del reflejo de enderezamiento viene de los estudios realizados con N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME). Estudios *in vitro* han demostrado que este inhibidor de la enzima óxido nítrico sintetasa, también inhibe la catalasa cerebral (ROTZINGER y cols., 1995). Por otro lado, ha sido demostrado que el L-NAME potencia la duración de la narcosis y prolonga la latencia hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento en ratas (ADAMS y cols., 1994). Estos datos puestos en relación irían en contra de los resultados obtenidos al utilizar como inhibidor el AT. Es decir, menos actividad de la catalasa y más narcosis.

En cuanto a los estudios realizados con ratones, encontramos los obtenidos a partir de mutantes acatalasémicos (C3H-A) (ARAGON y AMIT, 1993). Estos animales manifiestan una mayor sensibilidad a los efectos narcóticos del etanol que la misma

estirpe de ratones (C3H) que no habían sufrido la mutación. El resultado en este caso sería congruente con el dato obtenido L-NAME en ratas: menos catalasa más narcosis.

Por otro lado, ha sido demostrado que los ratones DBA/2 tienen un 35% más de catalasa cerebral que la estirpe C57BL/6 (ARAGON y AMIT, 1987) y que el tiempo que permanecen narcotizados los primeros ante una administración aguda de altas dosis de etanol es significativamente mayor que en los segundos (TABAKOFF y cols., 1976). Este dato nuevamente contradice al anterior, aunque es cierto que los ratones DBA y C57 son diferentes en muchos otros parámetros fisiológicos y bioquímicos que pudieran estar interviniendo en estos resultados (ARAGON y AMIT, 1987).

Como se puede apreciar a tenor de los datos expuestos, los resultados no son del todo concluyentes, pero los indicios más sólidos apuntan a que la inhibición de la catalasa por diferentes vías, da como resultado una potenciación de la narcosis. Una explicación para este fenómeno un tanto confuso sería que en este tipo de conducta exista una competición entre los efectos depresores producidos por la alta dosis de etanol, e incluso por la producción de acetato, y los excitatorios producidos por el acetaldehído formado en el SNC. Este hecho parece provocar que los efectos del acetaldehído se vean frecuentemente ensombrecidos por los de dosis de etanol tan elevadas como las que se utilizan en estas experiencias.

Dados estos antecedentes, el presente experimento abordó los efectos de dos manipulaciones que en nuestro trabajo habían demostrado ser potenciadoras (acetato de plomo administrado agudamente IP) o inhibitoras (acetato de plomo administrado crónica y oralmente) de la actividad de la catalasa cerebral. Se evaluó el efecto que ambas manipulaciones ejercían en el tiempo de recuperación del reflejo de enderezamiento inducido por etanol y en la latencia en la pérdida de este reflejo en ratones. Asimismo, también evaluamos si se afectaban los niveles plasmáticos de etanol con los diferentes tratamientos.

Para este experimento, nuestras predicciones fueron:

- 1.- La administración aguda de etanol en un rango de dosis de 4.0 a 4.5 g/kg produciría pérdida del reflejo de enderezamiento en nuestra estirpe de ratones. Como vimos en las pruebas de dosis de etanol realizadas en la fase experimental II una dosis de etanol de 3.5 g/kg ya resultaba reducir la actividad locomotora. En el caso de los ratones tratados crónicamente con acetato de plomo la edad de los sujetos era mayor que en los experimentos agudos. Como hemos mencionado en la introducción teórica de



la presente fase experimental, los animales viejos son más sensibles a los efectos del etanol, tanto en conducta como en los niveles de etanol en sangre, que permanecen más elevados. Por ello en la administración crónica de acetato de plomo, utilizamos únicamente la dosis de etanol más baja (4.0 mg/kg).

2.- Basándonos en los resultados con ratones acatalasémicos, esperábamos que aquellas manipulaciones farmacológicas de la catalasa que produjeran una inhibición de la actividad de esta enzima se traducirían en una mayor duración de la pérdida de este reflejo. En este caso, consideramos aquellos periodos temporales, vías y dosis que para la administración crónica de acetato de plomo habían demostrado ejercer una reducción en la actividad de la catalasa.

3.- Por las mismas razones esperábamos encontrar una reducción en la duración de la narcosis en aquellos animales inyectados con acetato de plomo de manera aguda a los mismos intervalos temporales y dosis que habían demostrado inducir la actividad de la catalasa encefálica en estudios precedentes.

4.- En relación a los efectos sobre la latencia, nuestras hipótesis eran menos claras, pero dado que la manipulación con AT había supuesto una prolongación de la latencia y un acortamiento de la narcosis, esperábamos encontrar aplicando nuestras manipulaciones de la catalasa, los resultados opuestos a los hallados en duración de la narcosis.

5.- Esperábamos que los efectos observados en conducta no fueran debidos a una interferencia de estas sustancias con el metabolismo periférico del etanol y así obtener evidencia indirecta de que se trata de un proceso regulado por sistemas enzimáticos centrales. En nuestros estudios de actividad locomotora, donde la dosis utilizada fue mucho menor (2.5 g/kg), ya observamos que los niveles de etanol no diferían entre el grupo control y el grupo tratado con plomo. No obstante, consideramos necesario observar cual era el efecto ante dosis elevadas de etanol.

## **Materiales y métodos.**

En la presente fase experimental se registraron dos tipos de variables conductuales; latencia y duración en la pérdida del reflejo de enderezamiento inducidas por etanol, y como estudios bioquímicos; la determinación de niveles de etanol en sangre. No evaluamos el nivel de actividad de la catalasa cerebral dado que estas pruebas se habían realizado en las fases precedentes y en la presente no existía ninguna modificación de los tratamientos que modulan dicha actividad enzimática.

### **I. Estudios Conductuales.**

**Sujetos y Condiciones de Alojamiento.** Los animales y las condiciones de alojamiento de los mismos desde su llegada hasta el inicio de la fase experimental fueron iguales a las ya descritas en el apartado correspondiente de la fase experimental I.

**Drogas.** Las sustancias empleadas en los tratamientos aplicados a los sujetos experimentales fueron las siguientes:

- Acetato de Plomo (Panreac Química S.L.). Se preparó una disolución con agua destilada y acetato de plomo a una concentración de 500 ppm (583 mg en 1000 ml) para el tratamiento crónico y para la administración aguda el acetato de plomo fue disuelto en agua destilada a una concentración de 0.5 mg/ 10 ml y la vía de administración elegida fue la inyección intraperitoneal (IP).

-Acetato de Sodio (Sigma Aldrich, S.A.). Como control de la administración crónica del plomo, a un grupo de animales se le suministró como fluido, una disolución con agua destilada y acetato de sodio a una concentración de 500 ppm (500 mg en 1000 ml).

- Solución Salina. Se preparó una solución de cloruro sódico (Panreac Química S.A.) disuelto en agua destilada a una concentración de 0.9%. La vía de administración fue la inyección intraperitoneal (IP). Se utilizó como control del tratamiento agudo con plomo.

- Etanol. Se preparó una solución de alcohol etílico de 96° (Panreac Química S.A.) al 20 % v/v (21 ml en 100 ml de agua destilada). Las diferentes dosis empleadas fueron siempre tomadas de esta solución estándar. La vía de administración elegida para esta droga fue la inyección intraperitoneal (IP).

- Ketamina. Se preparó una solución de ketamina (5 g en 10 ml) a partir de un preparado comercial (Imalgene, Rhone Merieux Labs.) del cual se tomaron 0.6 ml, que se disolvieron en 5.4 ml de agua destilada. Con este producto se anestesió a los ratones antes de ser sacrificados para la toma de muestras de tejido. La vía de administración para esta sustancia fue la inyección intraperitoneal (IP).

**Procedimiento.** En el caso de los tratamientos agudos con acetato de plomo, los animales, una semana antes de las pruebas conductuales o bioquímicas, habían sido divididos aleatoriamente en dos grupos de 30 animales cada uno. Uno de estos grupos recibió una inyección con solución salina y el otro una dosis de plomo de 100 mg/kg. Utilizamos las dosis e intervalos temporales que más efectivos habían resultado en los experimentos de actividad locomotora. El día del test, estos dos grupos se dividieron nuevamente en dos subgrupos de igual número y cada uno de ellos recibió una de las dos dosis de etanol (4.0 ó 4.5 g/kg) y se procedió al registro de la latencia y posteriormente de la narcosis. Las dosis de etanol 4.0 ó 4.5 g/kg son consideradas narcóticas aunque no letales (la dosis letal para nuestra cepa de ratones es de 6.0 g/kg de etanol) (BUDAVARI y cols., 1989).

En el caso de la administración crónica, se mantuvo a los animales durante 60 días a concentraciones de 500 ppm de acetato de sodio o de plomo disuelto en la bebida y ese mismo día se les administró la dosis de etanol (4.0 g/kg, IP), pasando inmediatamente, al registro primero de la latencia y a continuación de la duración de la narcosis.

Para el registro de la **latencia** hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento, inmediatamente tras la administración del etanol, los animales eran colocados de manera individual en cajas como las utilizadas para alojarlos (cajas de plexiglás con superficie plana, pero sin serrín). Durante un total de diez minutos y a intervalos de dos, desde la inyección del etanol, se anotaba si el animal había perdido el reflejo de enderezamiento. El criterio utilizado fue el siguiente: si el animal permanecía en movimiento, se consideraba que no lo había perdido y si estaba parado el experimentador le daba la vuelta poniéndolo sobre su lomo. En el segundo caso, se consideraba que recuperaba el reflejo cuando se volvía sobre las cuatro patas tres veces

antes de un minuto. Si el animal no cumplía el criterio a los diez minutos desde la inyección de etanol se desestimaba para la prueba de duración. La latencia viene expresada como el minuto en que el animal pierde el reflejo.

Para la prueba de la **duración** de la pérdida del reflejo de enderezamiento se utilizaban los mismos animales que eran medidos en latencia. Cuando el animal cumplía el criterio de estado narcótico era colocado en posición horizontal sobre su lomo en un "lecho de narcosis" y un cronómetro iniciaba el registro del tiempo. El lecho de narcosis consistía en dos superficies planas de metacrilato unidas y apoyadas sobre una base, formando un ángulo de 45 grados. La duración se expresa en minutos (min) desde que el animal pierde el reflejo hasta el momento en que recupera este reflejo cumpliendo nuevamente el mismo criterio de volverse 3 veces sobre las cuatro patas antes de un minuto.

## **II. Estudios Bioquímicos.**

La variable registrada fue el nivel de etanol en plasma sanguíneo. Este control se hizo necesario dado que las dosis empleadas en narcosis (4.0 y 4.5 g/kg de etanol) son mucho mayores que las empleadas en actividad locomotora. Los animales utilizados para estas pruebas siguieron las mismas condiciones experimentales que aquellos que fueron evaluados en narcosis bajo los diferentes tratamientos, aunque para tener un mayor control del tiempo desde la administración de etanol utilizamos un grupo distinto de sujetos.

El tratamiento de las muestras de sangre, los productos químicos utilizados, el aparataje y el procedimiento fueron los mismos que los descritos en el apartado de estudios bioquímicos de la fase experimental I.

## **III. Análisis Estadísticos.**

Todos los datos fueron analizados utilizando pruebas estadísticas paramétricas. En concreto se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) donde las variables fueron entre sujetos. En los casos en los que se consideró necesario se aplicó un análisis *post hoc* de la interacción de los factores principales, para ver las diferencias entre grupos. Dicha prueba fue Fisher's Least Significant Difference Tests (LSD).

Para aquellas pruebas en las que sólo se comparaba la diferencia entre dos grupos, se aplicó el test T de Student de contrastes entre medias.

El programa estadístico utilizado fue STATISTICA 4.1. para MAC.

Las tablas con los resultados de cada análisis aparecen en el apartado de Apéndices.

## **Resultados.**

### **5.1. Acetato de plomo administrado de manera aguda.**

Dentro de este apartado vamos a considerar todas aquellas pruebas experimentales en las cuales el tratamiento farmacológico fue la administración aguda IP de acetato de plomo (100 mg/kg, 7 días antes del test).

**5.1.1. Latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento.** En esta prueba se cuantificó el promedio en minutos que los animales pertenecientes a cada grupo tardaban en perder el reflejo de enderezamiento, el cual era valorado a intervalos de dos minutos.

Un ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de etanol (4.0 / 4.5 g/kg) dio como estadísticamente significativo el factor dosis de plomo ( $F(1,56)=16.8$ ,  $p<0.01$ ) pero no el factor dosis de etanol y tampoco la interacción. Esto indicó que la latencia en perder el reflejo era la misma para estas dos dosis de etanol, ambas fueron equivalentes en la rapidez en que indujeron narcosis.

La prueba LSD reveló que los grupos tratados con plomo tardaban significativamente más tiempo en perder el reflejo de enderezamiento en relación a sus respectivos controles, aunque la mayor diferencia entre animales tratados con plomo y tratados con salina, se produjo en la dosis más baja de etanol ( $p<0.01$  para la dosis de 4.0 g/kg y  $p<0.05$  para la dosis 4.5. g/kg).

Un ANOVA de dos factores: Tratamiento (AcNa / AcPb) x días de postratamiento (0 / 40) dio como significativo el factor tratamiento ( $F(1,20)=20.2$ ,  $p<0.01$ ). Ni el factor días ni la interacción resultaron ser significativos.

El test LSD demostró que el acetato de plomo redujo la actividad de la catalasa encefálica tras 60 días de tratamiento ( $p<0.01$ ), grupo que en este caso habíamos considerado 0 días de retirada. Sin embargo, dichas diferencias ya no resultaron ser significativas tras 40 días de retirada de las disoluciones, lo cual parecía indicar que el efecto depresor del plomo sobre la actividad de esta enzima revirtió con el tiempo una vez que el ingreso del metal en el organismo se había detenido.

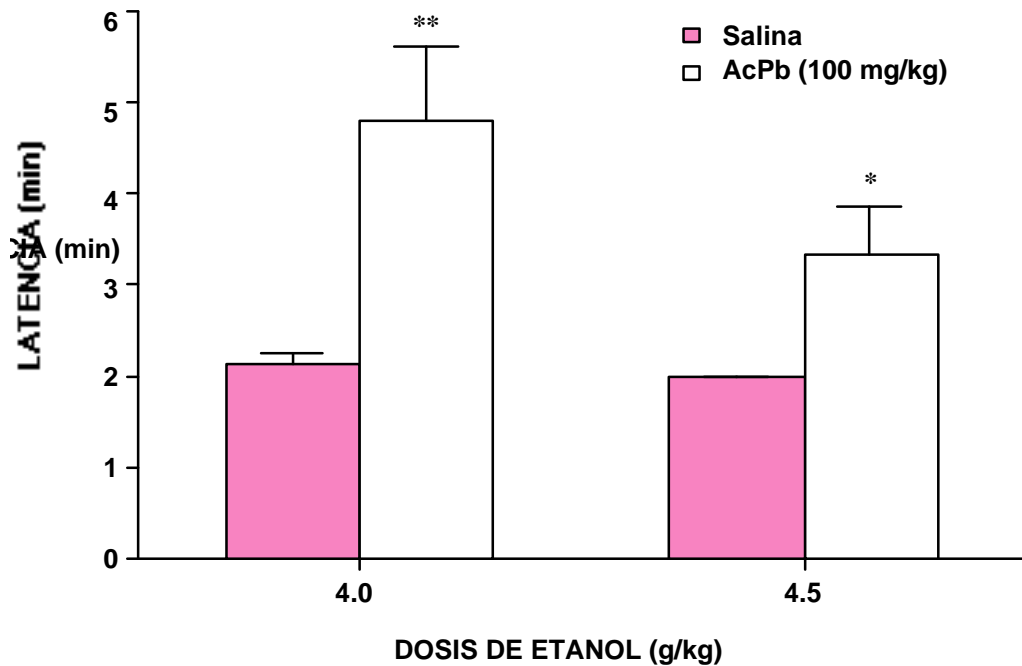


FIGURA N° 5.1.1.: Efecto de una administración aguda de salina o acetato de plomo (AcPb) sobre la latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento inducida por etanol. La latencia se registró inmediatamente después de la inyección de etanol y fue medida a intervalos de 2 minutos durante un total de 10 minutos. Salina o AcPb (100 mg/kg) fueron inyectados (IP) a los ratones 7 días antes del test. Media  $\pm$  EMS de los minutos que los sujetos tardan en perder el reflejo de enderezamiento (n=15 por grupo). (\*\*p<0.01, \*p<0.05 grupo AcPb significativamente diferente del grupo salina para la misma dosis de etanol).

**5.1.2. Duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento.** Estos animales fueron los mismos que aparecen en la prueba anterior ya que la latencia en la pérdida del enderezamiento es una conducta que precede al estado de narcosis.

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores: Dosis de plomo (0 / 100 mg/kg) x dosis de etanol (4.0 / 4.5 g/kg). Los análisis demostraron que existía un efecto diferencial de las dosis de etanol sobre la duración de la narcosis, (F(1,56)=37.3, p<0.01). En general, podemos decir que la dosis de etanol 4.5 g/kg indujo narcosis durante más tiempo que la dosis de 4.0 g/kg. Pero el efecto más interesante apareció en relación al factor dosis de plomo que también resultó ser estadísticamente significativo (F(1,56)=6.9, p<0.01). Aquellos animales tratados con plomo permanecían narcotizados durante menos tiempo que los animales que no habían tenido un contacto con el metal. La interacción entre los dos factores no resultó ser significativa.

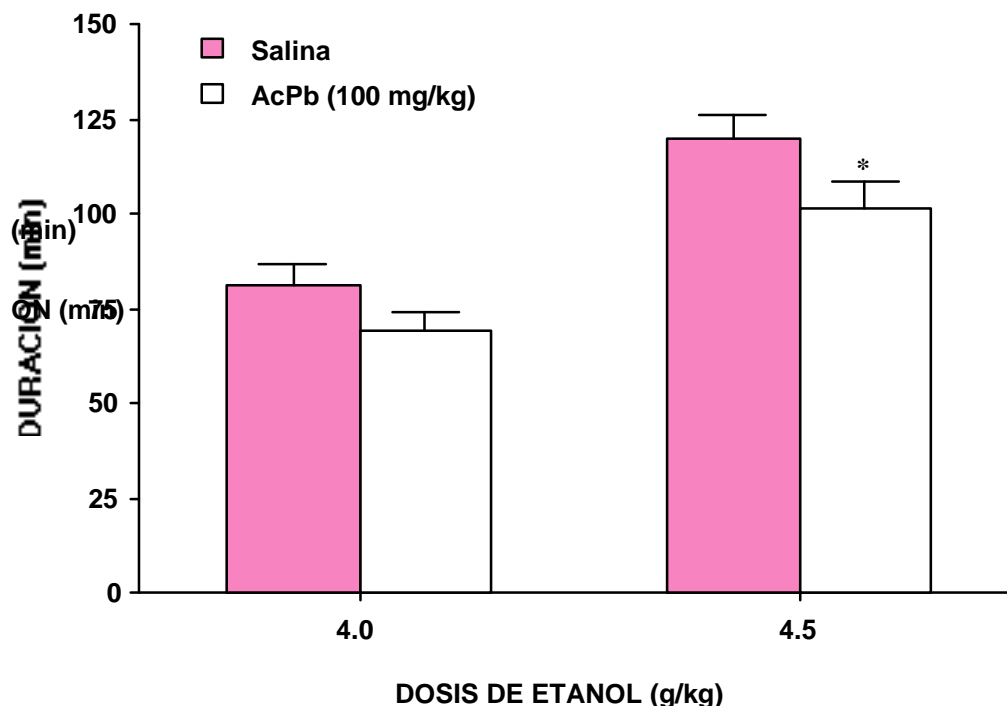


FIGURA N° 5.1.2.: Efecto de una administración aguda de salina o acetato de plomo (AcPb) sobre la duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento inducida por etanol. Salina o AcPb (100 mg/kg) fueron inyectados (IP) 7 días antes de la administración de etanol (4.0 ó 4.5 g/kg, IP). Media  $\pm$  EMS de los minutos que los sujetos tardan en recuperar el reflejo de enderezamiento (n=13 por grupo) (\*  $p < 0.05$  grupo AcPb significativamente diferente del grupo salina para la misma dosis de etanol).

Para las pruebas *post hoc*, aplicamos LSD-Fisher y pudimos comprobar que sólo en la dosis de etanol más alta (4.5 g/kg) la diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con plomo era significativa ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el porcentaje de reducción de narcosis entre controles y tratados con plomo es el mismo en las dos dosis de etanol (15%).

**5.1.3. Niveles de etanol en plasma.** Los grupos de animales utilizados para esta prueba fueron distintos a los que habían sido evaluados en conducta, aunque el procedimiento experimental previo a la obtención de la muestra fue el mismo.

Realizando una prueba T de Student para comparar las medias obtenidas, comprobamos que no existían diferencias significativas entre los niveles de etanol en sangre del grupo cuyo tratamiento fue acetato plomo con el grupo control.



En la tabla 5.1.3. aparecen las medias de los niveles de etanol en plasma de ambos grupos.

TABLA 5.1.3.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION AGUDA DE  
ACETATO DE PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE ETANOL  
EN SANGRE (mg/dl)

TIEMPO (minutos)	TRATAMIENTO	
	Salina	AcPb
60	408.0 ± 26.8	410.2 ± 7.8

Media ± EMS de etanol en sangre (mg/dl) tras una administración aguda IP de 4.5 g/kg de etanol en animales pretratados con solución salina o acetato de plomo (100 mg/kg, IP) 7 días antes de la medición. La sangre troncal fue recogida 60 minutos después de la administración de etanol (n=5 por grupo).

## 5.2. Acetato de plomo administrado de manera crónica.

Como en el anterior, dentro de este apartado vamos a considerar todas aquellas pruebas experimentales en las cuales el tratamiento farmacológico fue la administración crónica, oral de acetato de plomo (500 ppm, durante 60 días).

**5.2.1. Latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento.** Se siguió el mismo procedimiento que en el tratamiento agudo (promedio de los minutos que cada grupo tardaba en perder el reflejo de enderezamiento), pero como sólo se aplicó una dosis de etanol las diferencias entre los dos grupos de tratamiento (AcNa /AcPb) fueron estadísticamente analizadas mediante una prueba T de Student de contrastes entre medias. El resultado mostró que no existían diferencias entre los dos grupos de tratamiento.

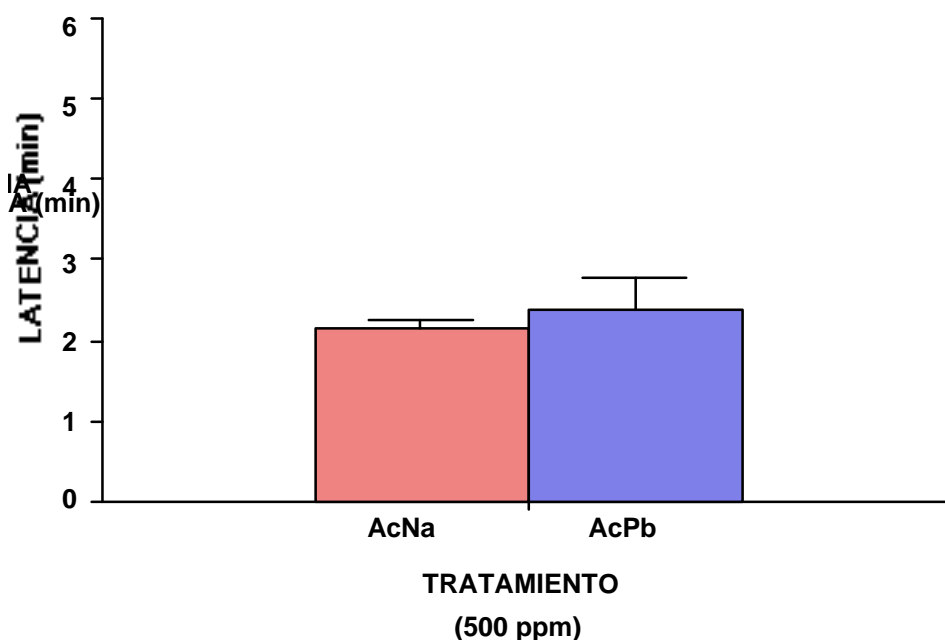


FIGURA N° 5.2.1.: Efecto de la administración crónica de acetato de plomo sobre la latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento inducida por etanol. La latencia se registró inmediatamente después de la inyección de etanol y fue medida a intervalos de 2 minutos durante un total de 10 minutos. Media  $\pm$  EMS de los minutos que los sujetos tardan en perder el reflejo de enderezamiento. Los ratones fueron expuestos a fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (grupo AcNa) o de acetato de plomo (grupo AcPb) durante 60 días antes de recibir una inyección de etanol (4.0 g/kg, IP) el día del test (n=15 por grupo).

### 5.2.2. Duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento.

En la figura N° 5.2.2. aparece representado el tiempo que cada grupo permaneció en estado narcótico.

Tal y como demuestra el contraste entre las medias de ambos grupos realizado mediante una prueba T de Student ( $t_{11}=-2.16$ ,  $p<0.05$ ) aparecieron diferencias significativas entre el grupo tratado con acetato de plomo y el grupo tratado con acetato de sodio. Los animales tratados con plomo durante 60 días permanecían narcotizados durante más tiempo que los animales que habían sido tratados con acetato de sodio.

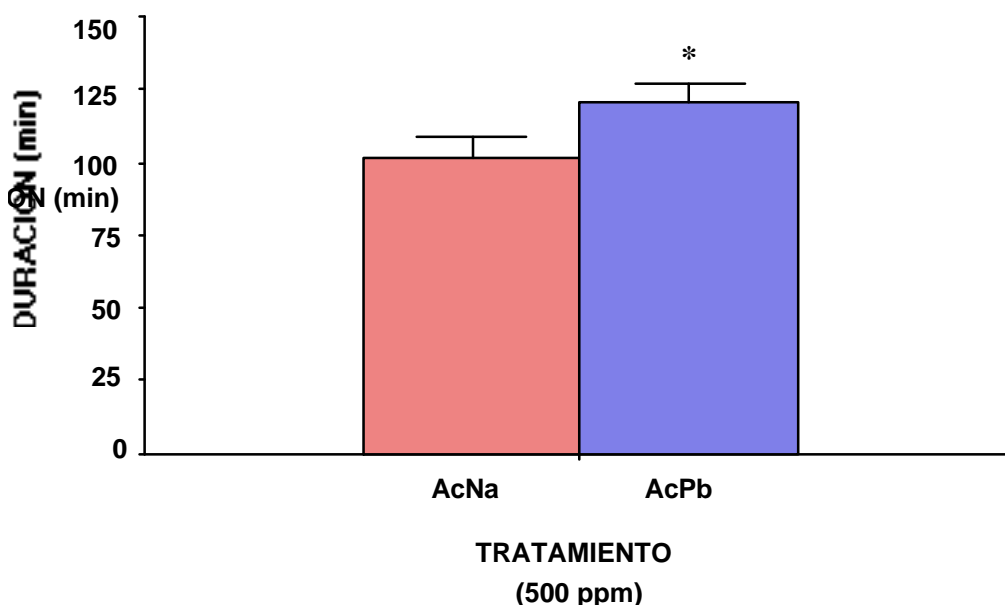


FIGURA N° 5.2.2.: Efecto de la administración crónica de acetato de plomo sobre la pérdida del reflejo de enderezamiento inducido por una administración de etanol. Media  $\pm$  EMS de los minutos que los sujetos tardan en recuperar el reflejo. Los ratones fueron expuestos a fluidos que contenían 500 ppm de acetato de sodio (grupo AcNa) o de acetato de plomo (grupo AcPb) durante 60 días antes de recibir una inyección de etanol (4.0 g/kg, IP) el día del test (n=14 por grupo). (\*  $p<0.05$  grupo tratado con AcPb significativamente diferente de grupo tratado con AcNa).

**5.2.3. Niveles de etanol en plasma.** Realizando una prueba T de Student para comparar las medias obtenidas, comprobamos que no existían diferencias significativas entre los niveles de etanol en sangre del grupo cuyo tratamiento fue acetato de sodio y los tratados con plomo.

En la tabla N° 5.2.3. aparecen las medias de los niveles de etanol en sangre de ambos grupos.

TABLA 5.2.3.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRONICO CON ACETATO DE PLOMO SOBRE LOS NIVELES DE ETANOL EN SANGRE (mg/dl)

TIEMPO (minutos)	TRATAMIENTO (500 ppm)	
	AcNa	AcPb
75	582.6 ± 46.2	586.4 ± 75.2

Media ± EMS de etanol en sangre (mg/dl) tras una administración aguda IP de 4.0 g/kg de etanol en animales tratados crónicamente con acetato de plomo (500 ppm) durante 60 días. La sangre troncal fue recogida a los 75 minutos de la administración de etanol (n=5 por grupo).

## **Discusión de los resultados.**

En nuestros resultados la administración aguda de plomo ha demostrado ejercer una interacción con el efecto del etanol sobre la conducta de narcosis. Los datos muestran un retraso en la latencia hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento junto a un acortamiento del estado narcótico en aquellos animales pretratados con el metal en relación a los animales control. Por lo tanto se trata de una interacción antagónica del plomo sobre ambas conductas inducidas por el etanol.

En el caso de la latencia existe un porcentaje de los animales tratados con plomo que no perdieron el reflejo de enderezamiento y por tanto no alcanzaron el estado narcótico: 10% para la dosis de 4.5 g/kg y en torno al 15% para la dosis de 4.0 g/kg. En el caso de los animales control, ambas dosis de etanol produjeron la pérdida del reflejo y por tanto, la inducción del estado narcótico al 100% y prácticamente en todos los casos desde el segundo minuto después de la inyección de etanol.

Los datos sobre la duración demostraron que la demora en la recuperación del reflejo de enderezamiento sólo se veía afectada cuando la dosis de etanol administrada fue 4.5 g/kg, y no en la dosis menor (4.0 g/kg), aunque el porcentaje de reducción en relación a los grupos control, se mantuvo constante en ambas dosis. Podemos concluir que sólo cuando el tiempo de narcosis alcanzó un cierto nivel, se hicieron patentes las diferencias entre grupos de tratamiento.

Asumimos que la administración del plomo en estos animales produjo una inducción de la actividad de la catalasa, dado que así ocurrió en fases precedentes bajo las mismas condiciones experimentales. El único precedente de los estudios conductuales de interacción de plomo administrado de manera aguda y etanol lo hemos hallado, precisamente, en narcosis inducida por etanol en ratas (SWARTZWELDER, 1984). En este estudio se utilizó una inyección aguda subcutánea (SC) de trimetilo de plomo (TML) administrado 14 días antes de la administración de una dosis (IP) narcótica de etanol. Los resultados demuestran que el plomo reduce la narcosis inducida por etanol y aumenta la latencia en la pérdida del reflejo de enderezamiento, por lo tanto son totalmente paralelos a los obtenidos en el presente trabajo. Si asumimos, dados nuestros resultados sobre la catalasa en las fases experimentales I y III y los revisados en la literatura (VALENZUELA y cols., 1989; SOMASHEKARAI AH y cols., 1992), que un tratamiento agudo con plomo genera una potenciación de la actividad de la catalasa encefálica y que esta potenciación aparece transcurrido cierto tiempo desde la

administración del metal, podemos decir que la disminución en la duración de la narcosis y el aumento en la latencia observados en el trabajo de Swartzwelder (1984) y en el presente estudio, se dan conjuntamente a un aumento de esta actividad enzimática.

Asimismo, hemos podido demostrar que la administración de plomo crónico suponía un aumento en la duración de la pérdida del reflejo de enderezamiento en los ratones y que no se vio reflejado ningún cambio, en función del tratamiento, en la latencia. En este caso, podemos suponer que este cambio conductual debido a la interacción entre el plomo crónico y el etanol iba paralelo a una disminución de la actividad de la catalasa, dado que así ocurrió en la fase experimental IV, donde se impusieron las mismas condiciones experimentales. Estos datos coincidirían con los observados utilizando ratones mutantes acatalasémicos (ARAGON y AMIT, 1993), con los datos de ratas tratadas con el inhibidor de la catalasa L-NAME (ROTZINGER y cols., 1995; ADAMS y cols., 1994) y con datos de otros autores que sin medir los niveles de actividad de la catalasa emplean situaciones experimentales que en otros estudios han demostrado representar niveles de catalasa encefálica diferentes, en concreto trabajos donde se mide la narcosis de ratas viejas y jóvenes (LITTLE y cols., 1996) y aquellos que indican diferencias en los niveles de catalasa de roedores en diferentes fases evolutivas (HAMBY-MASON y cols., 1997).

Junto a los resultados conductuales, hemos observado que no surgió ninguna alteración de los niveles plasmáticos de etanol como consecuencia de la administración aguda o crónica del plomo, lo cual descarta una interferencia a nivel periférico del plomo sobre el metabolismo del etanol, e indirectamente desestima el papel de la catalasa hepática en dicho metabolismo. Este resultado es acorde con los obtenidos en fases anteriores, donde los niveles de etanol administrados eran considerablemente menores. También mostrarían congruencia con otros estudios realizados en ratones, en los cuales la acatalasemia genéticamente determinada (ARAGON y AMIT, 1993), no supuso cambios en el metabolismo periférico de altas dosis de etanol. Sin embargo, en estudios realizados en ratas con altas dosis de etanol administradas IP (TAMPIER y cols. 1988; ARAGON y cols., 1991c,d; ARAGON y AMIT, 1993) las manipulaciones de la catalasa, con inhibidores farmacológicos como el AT (TAMPIER y cols. 1988; ARAGON y cols., 1991c,d) produjeron niveles de etanol en plasma incrementados tras 120 minutos desde la administración del etanol.

Comparando los resultados aquí obtenidos con los de fases precedentes donde las manipulaciones farmacológicas son las mismas pero la conducta evaluada es la actividad locomotora, encontramos una total coherencia de resultados. La dirección del

cambio en actividad de la catalasa cerebral guarda una relación directa con la dirección del cambio en actividad locomotora inducida por etanol y una relación inversa con la duración de la narcosis inducida por etanol. También existiría una relación directa con la latencia hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento. A más catalasa cerebral más actividad locomotora inducida por etanol, más tiempo para perder el reflejo de enderezamiento y menos tiempo que el animal permanece en estado narcótico. Por otro lado, nuevamente encontramos un efecto en conducta opuesto cuando la administración del plomo se realiza de manera aguda a cuando ésta es crónica. Cuando el plomo se administra de una manera aguda la narcosis inducida por etanol se acorta y cuando la administración de plomo es crónica la duración de la narcosis se prolonga.

## ***CAPITULO 6.***

### ***DISCUSION GENERAL.***

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de acetato de plomo modula la actividad de la enzima catalasa, así como las dos conductas inducidas por etanol evaluadas en el presente trabajo. Resumiendo, podríamos decir que el acetato de plomo administrado de manera aguda potencia la actividad de la enzima, la deambulaci3n inducida por etanol, retrasa la p3rdida del reflejo de enderezamiento y acorta la duraci3n narcosis. Por contra, el acetato de plomo administrado cr3nicamente inhibe la actividad de la catalasa, la actividad locomotora inducida por etanol y prolonga la duraci3n de la narcosis. Los efectos producidos por las manipulaciones de los factores tiempo y dosis sobre la potenciaci3n de la catalasa y la correlaci3n entre dos de las variables dependientes (actividad de la catalasa y actividad locomotora inducida por etanol), son tomados como indicios de la relaci3n entre ambos efectos.

El intervalo de inyecci3n entre acetato de plomo administrado de manera aguda y etanol es un factor cr3tico para el signo y tama1o de la interacci3n entre ambos compuestos. Concretamente, transcurrida una semana desde la administraci3n del plomo y con la dosis de 100 mg/kg es cuando se observa de manera m3s s3lida la potenciaci3n de la deambulaci3n mediada por etanol as3 como la actividad de la catalasa. Estos resultados son congruentes con los precedentes de otros estudios donde se muestra que la actividad de la catalasa se incrementa progresivamente con el tiempo despu3s de la administraci3n de plomo (VALENZUELA y cols., 1989; SOMASHEKARAI AH y cols., 1992), al igual que sucede en el presente trabajo. Estos autores han sugerido varios mecanismos para la potenciaci3n producida por el plomo sobre la catalasa. Por ejemplo, Valenzuela y cols. (1989) han especulado acerca de la posibilidad de que un incremento en la formaci3n de lipohidroper3xidos en el cerebelo de las ratas intoxicadas con plomo puede servir como se1al para mantener mayores niveles de catalasa que potencien los procesos detoxificadores. La potenciaci3n dilatada en el tiempo de la catalasa tambi3n est3 bien documentada en los resultados de otros autores (SOMASHEKARAI AH y cols., 1992) los cuales concluyen que la



administración de plomo causa un descenso en las enzimas antioxidantes de embriones de pollo 9 horas después de la inyección del metal, circunstancia que supone una situación favorable para el aumento de los procesos de lipidoperoxidación. Sin embargo, tras 72 horas, en este mismo estudio, los niveles de lipidoperoxidación decrecen hasta alcanzar valores normales y esto es paralelo al aumento significativo de enzimas antioxidantes como la catalasa.

También podemos afirmar que la interacción plomo agudo-etanol no se limita a una dosis de etanol, sino que parece extenderse para varias dosis capaces de inducir la actividad locomotora en esta estirpe de ratones, siendo la de 2.5 g/kg de etanol la que más deambulación induce en interacción con el plomo y sin ella.

Los datos señalan que esta potenciación es específica para el etanol y que no se produce interacción con otras drogas que estimulan la actividad locomotora, a excepción del metanol que, como ya discutimos, en roedores es un substrato de la catalasa. Proponemos que el plomo ejerce la potenciación en el caso del etanol porque estimula la actividad de la principal enzima que lo metaboliza en el cerebro. Nuestros datos están en sintonía con observaciones realizadas utilizando inhibidores de la catalasa como la cianamida o el AT (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999; ARAGON y cols., 1985a; ARAGON y AMIT, 1993). En el primer estudio la administración de *d*-anfetamina no se tradujo en un efecto sobre la actividad locomotora diferente entre el grupo control y el tratado con cianamida (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999). En los trabajos realizados con AT, este compuesto no modificó varios tipos de conductas inducidas por drogas como la morfina, el cloruro de litio (ARAGON y cols., 1985a) o el pentobarbital en el caso de la narcosis (QUINTANILLA y cols., 1980). Junto a estos, los estudios con ratones acatalasémicos han revelado que la disminución en actividad locomotora en la subestirpe con menores niveles de catalasa es un efecto específico para el etanol y no para la cocaína (ARAGON y AMIT, 1993). Todos estos trabajos, apuntan a que la modulación en la actividad de la catalasa es una variable que únicamente repercute en aquellas conductas inducidas por el etanol y no por otras drogas.

Junto a esto, proponemos que los efectos del plomo no son atribuibles a un cambio en los niveles periféricos de etanol ya que estos no se encuentran alterados en relación al control en ninguna de las condiciones experimentales, como ya ocurría en los trabajos donde se inhibía la catalasa con AT, cianamida o azida sódica (ARAGON y cols., 1985a; 1989; 1991a,b; SANCHIS-SEGURA y cols., 1999). Todo junto sugiere que tanto el plomo, como el AT, la cianamida o la azida sódica modulan las conductas

inducidas por el etanol a través de sus acciones en el SNC. Estos resultados son congruentes con la hipótesis de que el acetaldehído, producido en el mismo SNC, es el agente responsable de estos niveles incrementados de deambulación en ratones tratados con ciertas dosis de alcohol.

Asimismo, se evidencia que dicho efecto potenciador del plomo sobre la deambulación inducida y sobre la actividad de la catalasa, antagoniza con el efecto del inhibidor de la catalasa más ampliamente estudiado: el 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT). El aminotriazole es capaz de retornar a valores cercanos a los controles la incrementada actividad locomotora inducida por etanol en ratones a los que se les ha inducido la catalasa cerebral mediante un tratamiento agudo con plomo. Hay que señalar que estos resultados son importantes porque, no sólo validan otros similares previamente obtenidos mediante el uso de AT en interacción con diferentes conductas inducidas por etanol y sobre la actividad de la catalasa cerebral (ARAGON y cols., 1985a; 1989; 1991c; 1992a; ARAGON y AMIT, 1987; 1992; 1993; TAMPIER y cols., 1988; 1994 ROTZINGER y cols., 1994; KOEHLING y AMIT, 1994), sino que además suponen un indicio de que ambas sustancias ejercen un efecto en la deambulación inducida por etanol a través de su acción sobre la actividad de la mencionada enzima cerebral, como ya ha sido sugerido por los resultados sinérgicos de dos inhibidores de la catalasa (Cianamida-AT), tanto en deambulación inducida por etanol como en actividad enzimática (SANCHIS-SEGURA y cols., 1999). Otro antecedente de la aditividad de efectos sobre la actividad locomotora inducida por etanol, aparece en animales genéticamente deficientes en catalasa tratados con AT (ARAGON y AMIT, 1993).

Este antagonismo de acciones del plomo y el AT sugiere que, de manera directa o indirecta, ambas sustancias coinciden en los mecanismos bioquímicos que regulan la actividad de esta enzima y en los mecanismos neurales que regulan la conducta de actividad locomotora inducida por etanol.

Todos estos datos, junto a la alta correlación hallada ( $r=0.99$ ) entre actividad locomotora inducida por etanol y actividad de la catalasa cerebral, sugieren un mecanismo común en algún punto para el plomo, el AT y el etanol.

Por lo tanto, los datos obtenidos en el presente estudio muestran que diferentes niveles de actividad de la catalasa cerebral contribuyen de una manera esencial en los cambios observados en deambulación inducida por etanol. La revisión de los estudios encontrados acerca de las manipulaciones de la catalasa (farmacológicas o genéticas) tanto en ratas como en ratones, demuestra que la inhibición de la catalasa se traduce

consistentemente en una atenuación de las conductas inducidas por etanol (TAMPIER y cols., 1988; ARAGON Y AMIT, 1992; 1993; ARAGON y cols., 1992; 1991b,c; KOECHLING y AMIT, 1994). Nuestro trabajo permite añadir a lo anterior que lo mismo ocurrirá si el cambio en actividad de la catalasa es en dirección opuesta, es decir, un incremento de actividad.

Junto a esto, el significativo nivel de correlación encontrado entre ambos tipos de variables (conductuales y bioquímicas) parece indicar que ambos parámetros responden a un mecanismo común. Así, tomando el índice de correlación de Pearson como criterio, podemos suponer que el porcentaje de varianza de la actividad locomotora explicado desde esta manipulación de la actividad de la catalasa cerebral (el plomo administrado de manera aguda), puede cifrarse en un 76.2% en el caso de la respuesta temporal de la administración de plomo y en un 98.2% en el caso de la respuesta ante diferentes dosis de acetato de plomo y/o de AT. No obstante y a partir de los datos de la correlación, dado que la actividad de la catalasa no explica el 100% de la varianza es necesario señalar que otras variables participan en el resultado conductual finalmente observado.

Con el propósito de descartar y controlar otras variables, en el presente trabajo, se ha comprobado la inocuidad de los tratamientos sobre la actividad espontánea de los sujetos experimentales. De este modo, difícilmente puede suponerse que la observada potenciación de la actividad locomotora inducida por etanol depende de algún tipo de efecto de estas sustancias (AcPb o AT) *per se* sobre la deambulación espontánea. Este hecho indica que los efectos del plomo se producen sobre estructuras y circuitos que median factores ligados a la conducta inducida por etanol.

Una gran cantidad de trabajos realizados acerca de la interacción del acetato de plomo administrado de manera crónica en interacción con el etanol, han encontrado efectos antagónicos en conductas inducidas por etanol (BRIVET y cols., 1990; NATION y cols., 1987; 1991a,b; DAVIS y cols., 1993a; GROVER y cols., 1993b; BURKEY y NATION, 1994). En nuestro caso el tratamiento crónico con plomo también se ha traducido en un antagonismo en una de las conductas inducidas por etanol: la actividad locomotora. Asimismo, este antagonismo también aparece reflejado en los niveles de actividad de la enzima cerebral catalasa. No obstante, en el caso de la narcosis, los resultados demuestran una potenciación de los efectos inducidos por el etanol en los animales tratados crónicamente con plomo.

Por otro lado, los regímenes de exposición al acetato de plomo produjeron una concentración significativa de plomo en el cerebro de los ratones. Esta acumulación ha sido propuesta como el mecanismo causante de la disminución de algunas enzimas antioxidantes y con ello de un aumento en la lipidoperoxidación (HERMES-LIMA y cols., 1991; SANDHIR y cols., 1994). La comparación de la acumulación de plomo en cerebro conseguida tras una exposición aguda o crónica a la misma forma química del metal (AcPb) induce a pensar que la exposición aguda es más eficaz que la administración crónica en el efecto de bioacumulación. Esta conclusión encuentra precedentes en la literatura (BLAKE, 1974; RABINOWITZ y cols., 1976; DABROWSKA-BOUTA y cols., 1996). En los dos primeros estudios la administración aguda de plomo marcado radiactivamente (Pb 203 y Pb 204) demostró que la acumulación de plomo en el organismo en general es mucho mayor cuando la administración es aguda que cuando es crónica. La administración aguda produjo una retención del 85% del plomo a las 96 horas de ser administrado. Cuando la administración se produjo durante 124 días, la acumulación solo alcanzó el 13% ya que se llegó a un equilibrio entre el plomo administrado y el absorbido. En nuestro caso hemos comprobado que la administración crónica de plomo durante 60 días produce niveles inferiores de plomo en cerebro que la administración aguda de plomo incluso 11 días después de su administración. El tercer estudio (DABROWSKA-BOUTA y cols., 1996) demuestra que bajo un régimen de tratamiento agudo y crónico muy similares en dosis y vías de administración al nuestro, la concentración de plomo en los sinaptosomas es mayor con la administración aguda que con la crónica, aunque esta situación se invierte en el caso de la sangre y del hígado.

En varios de los trabajos conductuales de interacción plomo crónico-etanol revisados en el presente estudio (NATION y cols., 1991a,b), se propone la vía mesolímbica como un posible *locus* de interacción entre plomo y etanol. Los antecedentes para esta hipótesis vienen de dos tipos diferentes de fuentes. Por un lado están los trabajos que han demostrado que la exposición a plomo ocasiona modificaciones en la biodisponibilidad de dopamina en el núcleo accumbens (MISALE y cols., 1984; LESLEY y cols., 1984; ROSSOUW y cols., 1987; POKORA y cols., 1996). Por otro lado, la administración IP de etanol ha demostrado incrementar los niveles extracelulares de dopamina en el mencionado núcleo (IMPERATO y DI CHIARA, 1986; YOSHIMOTO y cols., 1992). Sin embargo, mientras que estos estudios en conjunto proveen de pruebas que apoyan el sistema dopaminérgico como mediador psicofarmacológico de los efectos del plomo sobre las conductas inducidas por etanol, el dato aportado por la *d*-anfetamina en el presente trabajo es importante

para desestimar esta hipótesis. Al menos en las condiciones experimentales utilizadas en nuestros experimentos el efecto antidopaminérgico del plomo no se ve reflejado en la conducta inducida por la *d*-anfetamina ya que los animales control y los tratados con plomo manifestaron los mismos niveles de actividad. Por otro lado, los datos acerca de los efectos del plomo sobre la dopamina y sobre las catecolaminas en general son muy contradictorios. Algunos autores han encontrado que el plomo produce un decremento de la biodisponibilidad de dopamina en el núcleo accumbens (LESLEY y cols., 1984). Otros autores sin embargo, encuentran datos opuestos (ROSSOUW y cols., 1987; POKORA y cols., 1996) y un tercer grupo no observan ningún cambio sobre la dopamina, sino sobre otros sistemas de catecolaminas (GOLTER y MICHAELSON, 1975). Estos resultados opuestos quizá sean debidos a la diversidad de condiciones experimentales empleadas en los estudios con plomo: periodos y niveles de exposición, vías y tipos de administración, estirpes de animales, etc.

Finalmente, comparando los resultados hallados en las dos variables conductuales evaluadas: actividad locomotora y narcosis inducidas por etanol, teniendo en cuenta que las manipulaciones farmacológicas son las mismas, encontramos una total coherencia de resultados. La dirección del cambio en actividad de la catalasa cerebral guarda una relación directa con la dirección del cambio en actividad locomotora inducida por etanol y una relación inversa con la duración de la narcosis inducida por etanol. También existe una relación directa con la latencia hasta la pérdida del reflejo de enderezamiento. A más catalasa cerebral más actividad locomotora inducida por etanol, más tiempo para perder el reflejo de enderezamiento y menos tiempo que el animal permanece en estado narcótico. Por otro lado, nuevamente encontramos un efecto en conducta opuesto cuando la administración del plomo se realiza de manera aguda a cuando ésta es crónica. Cuando el plomo se administra de una manera aguda la narcosis inducida por etanol se acorta y cuando la administración de plomo es crónica la duración de la narcosis se prolonga.

De todo ello podríamos concluir que una disminución en el metabolismo cerebral del etanol mediado por la catalasa y por tanto, una disminución en los niveles centrales de acetaldehído prolongarían el estado narcótico en ratones. Esto nos lleva a pensar que es el etanol el responsable del efecto depresor y el acetaldehído del efecto activador. Podría ser que en este tipo de conducta exista una competición entre los efectos depresores producidos por las altas dosis de etanol y los excitatorios producidos por el acetaldehído formado en el SNC.

Otro elemento podría formar parte de la ecuación: el acetato y su transformación en adenosina, conocido depresor del sistema nervioso central (NAGY y cols., 1990; CARMICHAEL y cols., 1991; CULLEN y CARLEN, 1992; ISRAEL y cols., 1994). La adenosina formada endógenamente a través del metabolismo central del acetato ha demostrado mediar algunos de los efectos depresores del etanol como por ejemplo la coordinación motora medida en una cinta en movimiento y la actividad locomotora (ISRAEL y cols., 1994). Otros autores han demostrado la mayor sensibilidad a los efectos depresores de la adenosina en ratones seleccionados por su mayor sensibilidad a los efectos narcóticos del etanol: ratones "*Long sleep*" (PROCTOR y DUNWIDDIE, 1984). Al acetato formado en el propio cerebro se le puede sumar el procedente del metabolismo periférico del etanol, ya que el acetato es una molécula que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Sin embargo, no existe una potenciación inducida por plomo de la ALDH, como demuestran otros trabajos (FLORA y TANDOM, 1987), con lo cual no tenemos indicios de que nuestras manipulaciones estén afectando la producción central ni periférica de acetato a partir del acetaldehído. Así pues, proponemos que en relación a la narcosis, por un lado tendríamos los efectos depresores del etanol sumados al acetato-adenosina antagonizando los efectos activadores del acetaldehído. Por lo tanto, los resultados obtenidos con dosis narcóticas de etanol parecen indicar que el acetaldehído jugaría un papel secundario en las modificaciones de la narcosis inducida por etanol. Este resultado estaría en concordancia con la idea de que diferentes conductas pueden estar mediadas por diferentes elementos de la cadena metabólica del etanol (ARAGON y AMIT, 1985). En conclusión, aunque el acetaldehído no sea la molécula responsable de la conducta de narcosis inducida por etanol, sí que puede desempeñar un efecto modulador (antagónico) sobre la duración del mencionado estado narcótico.

Los datos aportados en estos cinco experimentos parecen corroborar la relación de la catalasa cerebral y de algunas conductas inducidas por etanol. Por tanto, la idea de la existencia de una oxidación central del etanol a acetaldehído vía la catalasa recibe un mayor apoyo y con ello la hipótesis de que el acetaldehído formado centralmente tiene algún papel en las conductas derivadas de la interacción del etanol con el substrato neural. También con el presente trabajo resolvemos algunos de los problemas y puntos débiles planteados en relación a la hipótesis de la catalasa que en los últimos años han aparecido en la literatura (HUNT, 1996; SMITH y cols., 1997; ZIMATKIN y DEITRICH, 1997).

Nuestros datos conductuales se ven refrendados por las pruebas *in vivo* e *in vitro* del metabolismo central del etanol. El punto de partida de esta hipótesis fueron los trabajos de Cohen y cols. (1980) donde se sugirió que la catalasa cerebral dependiente de peróxido de hidrógeno, podía metabolizar etanol a acetaldehído. Esta interacción catalasa-etanol fue evaluada a partir de estudios *in vitro* con homogeneizados cerebrales en los cuales se inhibió la actividad de la catalasa cuando fueron incubados con cianamida (inhibidor de la catalasa) y en los que el pretratamiento con etanol previno de dicha inhibición, demostrando con ello que el etanol se unía a la catalasa (ARAGON y cols., 1991a). Estudios *in vivo* que registran la actividad de la catalasa cerebral también obtienen la prevención de la inhibición cuando el etanol es administrado previamente a los inhibidores de la catalasa (cianamida o 4-hidroxipirazol), los cuales disminuyen significativamente la actividad de esta enzima en los grupos que no reciben etanol (ARAGON y cols., 1991a). También encontramos los estudios *in vivo* que utilizan al AT como inhibidor del compuesto I (ARAGON y cols., 1991b). En este caso, la inhibición es dependiente del tiempo y también se previene cuando el etanol se administra previamente al AT. Otra serie de estudios en los que se analiza el efecto de la exposición crónica a etanol (en concentraciones fisiológicas) en un cultivo fetal de cerebro de rata (ASPERG y TOFFMAR, 1994), muestran que se produce un aumento inicial tanto de la actividad de la catalasa, como de la cantidad de esta enzima. Estos datos, en conjunto, sugieren una competición entre el etanol y los inhibidores del compuesto I (catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), así como de la actividad de esta enzima, confirmando con ello la generación y presencia de cantidades suficientes de peróxido de hidrógeno en el cerebro de rata.

Junto a estos encontramos los estudios acerca de la producción de acetaldehído en el cerebro. Varios estudios (ARAGON y cols., 1992b; GILL y cols., 1992) examinaron la capacidad del tejido cerebral para generar acetaldehído a partir de etanol. En ellos se observó que la adición al medio de cultivo de inhibidores de la catalasa como la azida sódica, la cianamida o el AT bloqueaban la producción de acetaldehído, mientras que la adición de peróxido de hidrógeno o de fuentes generadoras del mismo aumentaban dicha producción. Junto a esto, cuando se añadía al cultivo 4-metil-pirazole (inhibidor de la ADH) o metirapona (inhibidor de CYP450) no se producía ninguna alteración de la cantidad de acetaldehído producido. Por lo tanto los autores concluyeron que el acetaldehído puede ser formado en el cerebro durante la ingesta de etanol y que este proceso puede ser mediado a través de la catalasa cerebral. Asimismo, la cantidad de acetaldehído producido en el cerebro de rata se encuentra en un bajo rango (2.4-4.2 nM/hr/mg de proteína), pero éste puede tener significación biológica, especialmente si

tenemos en cuenta la cantidad de acetaldehído que desaparece a través de la oxidación llevada a cabo por la ALDH cerebral durante la incubación (ARAGON y cols., 1992b).

Más recientemente han surgido nuevas pruebas a favor de la presencia de acetaldehído en el cerebro procedente del metabolismo enzimático. En uno de estos estudios (EYSSERIC y cols., 1997), utilizando cultivos de astrocitos demostraron producir acetaldehído a partir de etanol de manera dosis dependiente (dosis fisiológicas). Esto se obtuvo descartando la oxidación espontánea de etanol. Otros autores (HAMBY-MASON y cols., 1997) han probado la producción *in vivo* de acetaldehído mediada por la catalasa en homogeneizados de cerebro fetal de rata procedentes de madres expuestas durante cortos periodos de tiempo a etanol. Demostraron también que esta producción es mayor en el estadio fetal que cuando las crías ya son adultas, debido a la mayor presencia de catalasa en el cerebro fetal. Asimismo, en este mismo estudio se controló que la producción de acetaldehído se detenía cuando al cultivo se le añadían inhibidores de la catalasa, pero no cuando se administraban inhibidores de la ADH ni del CYP450.

Junto a estos, los estudios de Zimatkin (ZIMATKIN y LINDROS, 1996) sobre la localización de la catalasa en estructuras concretas del cerebro y, más recientemente (ZIMATKIN y cols., 1998), de los niveles de producción de acetaldehído en diferentes áreas cerebrales apoyan la hipótesis de que, en ciertas estructuras cerebrales, la formación de acetaldehído vía la oxidación del etanol por la catalasa, es factible.

Pensamos que estas pruebas junto a otras principalmente conductuales, aportadas en diferentes trabajos que actualmente se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, supondrán un mayor respaldo al planteamiento de una presencia de metabolismo de etanol en el SNC, hecho que cada vez más autores empiezan a asumir en su visión de la farmacología del etanol (ZIMATKIN y cols., 1998; LANDS, 1998; KOSTOWSKI y BIENKOWSKI, 1999).

Las críticas principales al metabolismo vía la catalasa son la poca existencia de  $H_2O_2$  en el cerebro (entre 6 y 14 pM en ciertas áreas según Piandatosi y Trato (1990). No obstante el hecho de que los homogeneizados de cerebro en los estudios anteriormente mencionados (ARAGON y cols., 1991a, b; HAMBY-MASON y cols., 1997) lleven a cabo tal oxidación indican que debe haber cierta presencia de peróxido de hidrógeno. Es más, si tenemos en cuenta que las potenciales fuentes de  $H_2O_2$  puedan haberse diluido durante la homogeneización de los tejidos, quizá *in vivo* los niveles de peróxido detectados serían mayores (ZIMATKIN y DEITRICH, 1997).



Otra crítica que tradicionalmente se ha opuesto a la aceptación de la hipótesis del acetaldehído como molécula responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol, es la que argumenta las bajas concentraciones de esta sustancia detectadas en cerebro y la gran diferencia entre los niveles de metabolismo hepático y cerebral del etanol (entre 1/100 y 1/1000 veces menos en el cerebro que en el hígado) (ECKARD y cols., 1998). Sin embargo, dado que el acetaldehído formado a través de la catalasa se acumula en ciertas estructuras donde ésta se encuentra en mayor abundancia, es posible que por pequeña que sea esta cantidad de acetaldehído en comparación a los niveles hepáticos, sea suficiente para activar los mecanismos neurales responsables de los efectos psicofarmacológicos reforzantes atribuidos al etanol.

Por lo tanto, si el acetaldehído interactúa directa o indirectamente con aquellas estructuras cerebrales implicadas en los procesos motivacionales, la actividad de la catalasa puede ser un factor controlador en la afinidad de los organismos para ingerir etanol. En cualquier caso, la posibilidad de utilizar la catalasa cerebral como un primer modulador de los efectos del alcohol, previo a la mayor parte de sus manifestaciones conductuales es de un indudable interés incluso desde una vertiente aplicada o clínica. Aunque razones éticas obvias impiden repetir estas experiencias con humanos y comprobar así en qué grado la catalasa controla el consumo voluntario de alcohol, la validez ecológica del mecanismo propuesto parece quedar sobreguardada mediante algunos estudios correlacionales realizados y por los estudios de las diferencias genotípicas en los niveles de catalasa.

En este sentido, se ha podido constatar una correlación significativa y positiva ( $r=0.65$ ,  $p<0.001$ ) entre los niveles de la catalasa de los eritrocitos con los niveles de consumo de etanol de sujetos voluntarios (KOECHLING y AMIT, 1992). En otro estudio (KOECHLING y cols., 1995) se demostró que dicha relación era aún mayor cuando los sujetos poseían antecedentes familiares de alcoholismo que cuando no los poseían (familia+/familia-). Estos datos confirman, pues, otros previamente obtenidos con ratas (AMIT y ARAGON, 1988). Además, ya que en ambos estudios los niveles de catalasa eran la variable que explicaba un mayor porcentaje de la varianza, parece posible pensar que los niveles séricos de dicha enzima pueden ser un adecuado marcador de los niveles de consumo voluntario de etanol y/o del alcoholismo.

También los estudios realizados sobre etnias humanas y estirpes de ratones con niveles diferentes de la enzima catalasa (hipocatalasémicos) (ARAGON y AMIT, 1993; ARAGON y cols., 1992; AMIT y cols. 1998) apoyan la validez de la catalasa como predictor/modulador de la ingesta de etanol. Estos estudios parecen mostrar la

posibilidad de usar los niveles de catalasa sanguínea como índices del consumo voluntario de alcohol y/o el alcoholismo. Siguiendo esta hipótesis, han sido realizados estudios del consumo de alcohol en una población de judíos iraníes con una deficiencia genética en catalasa (40% menos catalasa que individuos de la misma etnia sin la mutación) (AMIT y cols. 1998). Los resultados muestran que la acatalasemia actúa como un factor limitante para estos individuos en el nivel de ingesta de alcohol.

Siguiendo este modelo, el acetaldehído en el sistema nervioso central podría mediar los efectos psicofarmacológicos recompensantes y/o reforzantes que instauran y mantienen el consumo de etanol, así como otros fenómenos causados por esta sustancia. Obviamente deben existir otros focos de variabilidad entre individuos en la explicación del reforzamiento/recompensa inducidos por etanol. Es decir, para una misma cantidad de acetaldehído en un periodo temporal dado, diferencias en los subsiguientes elementos neurales implicados en el mecanismo de acción del etanol deben provocar diferencias no explicables si nos atenemos únicamente al funcionamiento de las enzimas cerebrales.

Así, en resumen, existe un amplio número de pruebas, bioquímicas y conductuales, derivadas de manipulaciones genéticas y farmacológicas en animales experimentales y humanos, que señalan al acetaldehído como el agente responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol. Esta hipótesis ha sido defendida por diferentes autores a lo largo de las tres últimas décadas (AMIT y cols., 1976; 1985; 1986; 1989; LINDROS, 1978; MYERS y SINGUER, 1982; ZIMATKIN y LINDROS, 1996) aunque para ello era necesario la demostración de una ruta metabólica viable en el mismo sistema nervioso central (ARAGON y cols., 1991; 1992b; GILL y cols., 1992).

En este sentido, las pruebas más directas son aquellas en las que el acetaldehído se administra directamente en el encéfalo. Aunque el número de experimentos realizados con este procedimiento es pequeño, los datos obtenidos son muy clarificadores, ya que han sido obtenidos en paradigmas que evalúan situaciones de refuerzo. Así, se ha constatado que los animales aprenden a manipular una palanca para autoadministrarse acetaldehído intravenosamente (TAKAYAMA y UENO, 1985) o incluso en el encéfalo (BROWN y cols., 1979; 1980). Además, dosis similares a éstas son capaces de producir resultados positivos (SMITH y cols., 1984) en uno de los paradigmas de refuerzo más utilizados, la preferencia de lugar (*place preference*). Asimismo, la preferencia por el etanol se incrementa tras la administración crónica ICV de acetaldehído (MYERS y VEALE, 1969).

En los últimos años se han descrito algunos efectos derivados de la exposición del tejido cerebral al acetaldehído, *in vitro* (KURIYAMA y cols., 1987; POLDRUGO y SNEAD, 1985) e *in vivo* (BARBACCIA y cols., 1982) que refuerzan la idea de que éste producto podría mediar algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol, en tanto que vinculan esta sustancia a efectos y estructuras neurales implicadas en el mecanismo de acción de otras drogas de abuso. Sin embargo, la mayoría de estas descripciones se hallan en un momento inicial de su desarrollo y su significado conductual no ha sido evaluados (PASTORIC y cols., 1994; REDDY y SARKAR, 1993; REDDY y cols., 1995).

Por tanto, asumiendo que el metabolismo del etanol en el cerebro sea considerado un hecho probado, futuras investigaciones deberán ir encaminadas a esclarecer los mecanismos a través de los cuales el acetaldehído pueda elicitar efectos conductuales a través de su traducción a señales neurales principalmente mediadas por aquellos sistemas de neurotransmisión implicados actualmente en la acción de otras drogas de abuso.

Basándonos en los datos conductuales de los diferentes estudios sobre el tema, la asunción más parsimoniosa sobre los mecanismos subyacentes a los efectos de la catalasa sobre las conductas inducidas por etanol, es que la actividad de la catalasa determina la cantidad de acetaldehído producido en el cerebro. Este acetaldehído mediaría en los efectos reforzantes del etanol a través de su interacción con los sistemas de neurotransmisión implicados directamente en las conductas motivadas. Las pruebas que apoyan esta asunción son todavía escasas. Hay evidencia de que el acetaldehído central puede inducir la liberación de catecolaminas (TRUITT y WALSH, 1971). También hay datos que indican que la actividad de la enzima ALDH correlaciona positivamente con la actividad de la MAO y con otras medidas de actividad dopaminérgica (ZIMATKIN, 1991). Sin embargo, no se trata más que de pruebas indirectas que en ningún modo relacionan acetaldehído-dopamina-conductas inducidas por etanol.

Con todo, la noción de que el acetaldehído es el agente que media los efectos psicofarmacológicos de recompensa y refuerzo (que instauran y mantienen la conducta inducida por etanol) no resuelve la cuestión acerca del **mecanismo de acción** por los cuales éstos se producen en el sistema nervioso, simplemente, nos sitúa en una línea de partida diferente: nos encontramos ante un nueva molécula.

En este sentido, han existido diferentes propuestas acerca de cómo el acetaldehído podría generar estos efectos en el sistema nervioso central. Así, aunque el acetaldehído, como el etanol, parece capaz de intercalarse en las membranas plasmáticas de diferentes tipos de células (KENNEY, 1980), este efecto parece un mal candidato para explicar los efectos psicofarmacológicos derivados del consumo voluntario de alcohol, especialmente en lo que a recompensa/refuerzo se refiere. Las razones son análogas a las señaladas al referirnos al etanol (GOLDSTEIN, 1987), es decir, ausencia de especificidad, descorrelación temporal entre el efecto molecular y el conductual, etc.

Por otra parte, aunque parecen existir afectaciones localizadas sobre ciertas estructuras de la membrana plasmática, fundamentalmente proteicas, por la presencia del acetaldehído (SHIOHARA y cols., 1986), que podrían traducirse en cambios en la neurotransmisión, parece poco probable que este mecanismo pudiera posibilitar la especificidad necesaria para propiciar efectos conductuales complejos.

Asimismo, y también como decíamos al hablar del alcohol, la simplicidad estructural del acetaldehído parece descartar una relación de estereoespecificidad directa entre éste y algún receptor neural. Sin embargo, ésta podría producirse si el acetaldehído formara algún compuesto de mayor complejidad estructural. En este sentido, parece claro que el acetaldehído es una molécula mucho más reactiva que el etanol, debido fundamentalmente a la presencia de un grupo carbonilo que le permite interaccionar con una gran variedad de grupos nucleofílicos, especialmente si poseen algún grupo amino libre. Así, mediante este tipo de reacciones, el acetaldehído forma aductos que pueden ser inestables o estables. Respecto a los primeros, se ha demostrado que son especialmente frecuentes con grupos -NH<sub>2</sub>, -SH, guanido- e imidazol- de las proteínas (LUMENG y LIN, 1992).

De este modo, el acetaldehído, incluso a bajas concentraciones, es capaz de formar **aductos** con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (JENNET y cols., 1989). En el caso de los aductos formados con proteínas endógenas (albúmina, hemoglobina, etc), el acetaldehído presenta una especial afinidad por los grupos lisina de éstas, sin que se haya podido concluir el motivo exacto de la misma.

Por otra parte, también este tipo de aductos podrían ser interesantes, en caso de que se produjeran en el sistema nervioso central a partir del acetaldehído allí generado por la catalasa, en tanto que este tipo de compuestos sí podría presentar una estructura más compleja que posibilitara la estereoespecificidad con algún receptor neural. Esta alternativa no ha sido evaluada de forma específica, aunque parece ser un mecanismo

plausible en tanto que en el cerebro pueden encontrarse un gran número de polipéptidos con grupos amino. En este sentido, se ha documentado la posibilidad de que el acetaldehído forme, *in vitro* pero en concentraciones similares a las producidas en el metabolismo del etanol, aductos complejos mediante su interacción con substratos como las catecolaminas; dopamina y noradrenalina (NUÑEZ-VERGARA y cols., 1991).

En este sentido, especialmente durante la pasada década, algunos autores presentaron la posibilidad de que el acetaldehído podría formar algún tipo de compuesto con los metabolitos de neurotransmisores aminérgicos. Así, *in vitro*, se ha podido demostrar que como producto de estas reacciones de condensación entre acetaldehído y catecolaminas se generan una serie de compuestos conocidos genéricamente como **tetrahidroisoquinolinas (TIQs)**. Por otra parte, cuando estas mismas interacciones se producen con metabolitos aminérgicos se formarían otras macromoléculas conocidas como tetrahidro- $\beta$ -carbolinas (THBCs) (DEITRICH y ERWIN, 1984).

La posibilidad de que alguno de estos compuestos pueda estar implicado en los mecanismos de diferentes efectos psicofarmacológicos y/o conductuales del etanol ha sido muy controvertido. En este sentido, existen diferentes informes que parecen señalar que determinados regímenes de administración ICV de algunos de estas tetrahidroisoquinolinas (MYERS y cols., 1982) o tetrahidro- $\beta$ -carbolinas (ROMMELSPACHER y cols., 1987; TUOMISTO y cols., 1982) pueden incrementar la preferencia por el etanol en ratas expuestas a situaciones de libre elección. No obstante otros autores presentan clara evidencia de lo contrario (BROWN y cols., 1980).

De forma paralela, el salsolinol (posiblemente el TIQ más estudiado) ha demostrado poseer efectos bifásicos dependientes de dosis sobre la actividad locomotora de ratones, pudiendo llegar a generar pérdida del reflejo de enderezamiento. Este estrecho paralelismo con los efectos del alcohol, se ve nuevamente reafirmado al constatar que esta sustancia posee efectos diferenciales en dos estirpes seleccionadas por su respuesta a los efectos hipnóticos del etanol (*short /long sleep*) sin alterar otros que supuestamente no están mediados por el acetaldehído, como la hipotermia (SMOLEN y COLLINS, 1984).

Respecto al mecanismo de acción a través del cual estas sustancias podrían realizar estas funciones se han descrito diferentes posibilidades (DEITRICH y ERWIN, 1984). Así, respecto a los TIQs, se ha sugerido que podrían actuar como inhibidores

competitivos de determinadas enzimas implicadas en la síntesis de las catecolaminas, como el COMT, la MAO o la tirosín-hidroxilasa. No obstante las diferencias entre el umbral de saturación de las enzimas y las concentraciones predecibles de los TIQs, hacen muy improbable que este mecanismo tenga alguna relevancia *in vivo*.

Una segunda posibilidad señala que algunos TIQs, especialmente la tetrahidropapaverolina (THP), puede ser un importante precursor de diferentes compuestos con capacidad para actuar sobre el sistema de opiáceos endógenos. Sin embargo, la afinidad de los TIQ por estos receptores parece ser sólo un 50% del exhibido por agonistas opiáceos propiamente dichos. Finalmente, otra opción que se ha barajado es que las tetrahydroisoquinolinas actúen como falsos neurotransmisores en los diferentes sistemas catecolaminérgicos (DEITRICH y ERWIN, 1984).

En definitiva, pese al atractivo de esta hipótesis, las dificultades teóricas, así como las dificultades en la repetición de los datos inicialmente referidos (BROWN y cols. 1980; MYERS, 1995; AMIT y cols. 1982), han hecho que prácticamente esta idea haya quedado desestimada en los últimos años, reduciéndose notablemente el número de publicaciones relacionadas con ella. Es significativo que este hecho se produzca pese al incremento del interés por el papel de los opiáceos endógenos en el consumo voluntario de etanol, así como el uso de la naloxona en la terapéutica del alcoholismo (MYERS, 1994).

El abandono de las tetrahydroisoquinolinas y tetrahydro- $\beta$ -carbolinas como mediadores de las acciones del etanol vuelve a situarnos en el punto de partida. Es decir, seguimos sin poseer un mecanismo que explique los efectos psicofarmacológicos del etanol a partir de algún cambio en el funcionamiento del sistema nervioso.

Por otra parte, la demostración de la implicación de la catalasa como un parámetro crítico en la expresión de la conducta inducida por etanol se convierte en un cambio de perspectiva en la búsqueda de mecanismos de acción. En este sentido, es necesario reemprender muchos trabajos previamente realizados sobre las acciones moleculares del etanol y comprobar si el acetaldehído aporta alguna característica diferencial que permita vincular estas acciones con los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Asimismo, la posibilidad de administrar acetaldehído intracerebralmente deberá ser rescatada a fin de evaluar *in situ* los efectos de este compuesto, eliminando un primer foco de variabilidad interindividual: las enzimas de producción/degradación de este compuesto. En este sentido, las microinyecciones de éste en áreas localizadas del

encéfalo parecen un procedimiento de gran potencial para delimitar un posible circuito de los mecanismos responsables de las acciones psicotropas del etanol.

En definitiva, el descubrimiento de que el acetaldehído es, o forma parte del agente responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol, inaugura una nueva perspectiva en la consideración de la psiconeurobiología del mismo.

***BIBLIOGRAFIA***  
***Y***  
***APENDICES***



## ***BIBLIOGRAFIA.***

- AEBI, H. (1974). Catalase. En: *Methods of enzymatic analysis*. Vol III; 273-286; Bergmeyer, H.U. (ed). Verlag Chemie.
- AMIR, S. (1977). Brain and liver aldehyde dehydrogenase: Relations to ethanol consumption in wistar rats. *Neuropharmacology*, 16: 781-784.
- AMIR, S. (1978a). Brain aldehyde dehydrogenase: adaptative increase following prolonged ethanol administration in rats. *Neuropharmacology*, 17: 463-467.
- AMIR, S. (1978b). Brain and liver aldehyde dehydrogenase activity and voluntary ethanol consumption by rats: relations to strain, sex and age. *Psychopharmacology*, 57: 97-102.
- AMIT, Z.; ARAGON, C.M.G. (1988). Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary consumption: Possible evidence for a biological marker system of ethanol intake. *Psychopharmacology*, 95: 512-515.
- AMIT, Z.; SMITH, B.R. (1985). A Multi-dimensional examination of the positive reinforcing properties of acetaldehyde. *Alcohol*, 2: 367-370.
- AMIT, Z.; SMITH, B.R. (1989). The role of acetaldehyde in alcohol addiction. *Human metabolism of alcohol*. Volume II; 194-198; Crow, K.E. ; Batt, R.D. (eds.) CRC Press Inc.
- AMIT, Z.; LEITAN, E.; LINDROS, K.O. (1976). Suppression of ethanol intake following administration of dopamine- $\beta$ -hydroxylase inhibitors in rats. *Archives Internationales Pharmacodynamie Thérapie*, 223: 114-119.
- AMIT, Z.; SMITH, B.R.; BROWN, Z.W.; WILLIAMS, R.L. (1982). An examination of the role of TIQ alkaloids in alcohol intake: Reinforcers, satiety agents or artifacts?. En: *Beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines*. 345-364. Liss, A.R.
- AMIT, Z.; ARAGON, C.M.G.; SMITH, B.R. (1986). Alcohol metabolizing enzymes as possible markers mediating voluntary consumption. *Canadian J. Public Health*, 77 sup. 1: 15-20.
- AMIT, Z.; SMITH, B.R.; WEISS, S. (1999). Catalase as a regulator for the affinity to ingest alcohol in genetically determined acatalasemic individuals from Israel. *Alcohol*. (en prensa)
- ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1985). A two dimensional model of alcohol consumption: Possible interaction of brain catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol*, 2: 357-360.
- ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1987). Genetic variation in ethanol sensitivity in C57BL/6 and DBA/2: A further investigation of the differences in brain catalase activity. En: *Alcohol and the cell*. 398-401; Rubin, E. (ed). The New York Academy of Sciences.

- ARAGON, C.M.G.; AMIT Z. (1992). The effect of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: Evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action. *Neuropharmacology*, 31: 709-712.
- ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1993). Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: Systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 547-554.
- ARAGON, C.M.G.; SPIVAK, K.; AMIT, Z. (1985a). Blockade of ethanol-induced conditioned taste aversion by 3-amino-1,2,4-triazole: Evidence for catalase mediated synthesis of acetaldehyde in rat brain. *Life Sci.* 37: 2077-2084.
- ARAGON, C.M.G.; STERNKLAR, G; AMIT, Z. U. (1985b). A correlation between voluntary ethanol consumption and brain catalase activity in the rat. *Alcohol*, 2: 353-356.
- ARAGON, C.M.G.; ABITBOL, M.; AMIT, Z. (1986). Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. An examination using conditioned taste aversion paradigm. *Neuropharmacology*, 25: 79-83.
- ARAGON, C.M.G.; NICOLETTI, S.; AMIT, Z. (1987). Corticoesterone response to an acute dose of ethanol in naive and ethanol experienced rats. *Alcohol Alcohol.* 1: 345-349.
- ARAGON, C.M.G.; SPIVAK, K.; AMIT, Z. (1989). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced open field activity: Evidence for brain catalase mediation of ethanol's effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 13: 104-108.
- ARAGON, C.M.G.; ABITBOL, M.; AMIT, Z. (1991a). Ethanol-induced CTA mediated by acetaldehyde through central catecholamine activity. *Psychopharmacology*, 103: 74-77.
- ARAGON, C.M.G.; ROGAN, F.; AMIT, Z. (1991b). Dose- and-time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. *Biochem. Pharmacol.* 42: 699-702.
- ARAGON, C.M.G.; SPIVAK, K.; AMIT, Z. (1991c). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 55-59.
- ARAGON, C.M.G.; STOTLAND, L.M.; AMIT Z. (1991d). Studies on ethanol-brain catalase interaction: Evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15: 165-169.
- ARAGON, C.M.G.; PESOLD, C.N.; AMIT, Z. (1992a). Ethanol-induced motor activity in normal and acatalasemic mice. *Alcohol*, 9: 207-211.
- ARAGON, C.M.G.; ROGAN, F.; AMIT, Z (1992b). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochem. Pharmacol.* 44: 93-98.
- ARAGON, C.M.G.; SPIVAK, K.; SMITH, B.R; AMIT, Z. (1993). Cyanamide on ethanol intake: How does it really work?. *Alcohol Alcohol.* 23: 413-421.
- ASDA, K.; TAKAHASHI, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 21: 1295-1307.
- ASPEBERG, A.; TOTTMAR, O. (1994). Ethanol-induced increase in catalase activity in reaggregation cultures of rat brain cells is due to increased oligodendrocyte differentiation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18: 620-624.

- AUDESIRK G; AUDESIRK T. (1991) Effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels in N1E-115 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 12: 519-528.
- BARAONA, E.; DIPADOVA, C.; TABASCO, J.; LIEBER, C.S. (1987). Transport of acetaldehyde in red blood cells. En: *Advances in biomedical alcohol research: 139-147*. Lindros K.O. y cols. (eds). Pergamon Press.
- BARBACCIA, M. L.; BOSIO, A.; SPANO, P. F.; TRABUCCHI, M. (1982). Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover. *J. Neural Transmiss.* 53: 169-177.
- BARRY, P.S.I. (1975). A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Brit. J. Ind. Med.* 32: 119-139.
- BECK, O.; HELANDER, A.; CARLSSON, S.; BORG, S. (1995). Changes in serotonin metabolism during treatment with the aldehyde dehydrogenase inhibitors disulfiram and cyanamide. *Pharmacol. Toxicol.* 77: 323-326.
- BENDER, J.R.; REINHARDT, C.F.; MULLIN, L.S. (1982). Formaldehyde toxicity. *JAMA*, 248: 308-309.
- BERGAMASCHI, S.; YOYOVONI, S.; RIUS, R.A.; TRABUCCHI, M. (1988). Acute ethanol and acetaldehyde administration produce similar effects on L-type calcium channels in rat brain. *Alcohol*, 5: 337-340.
- BERKALOFF, A.; BOURGUET, J.; FAVARD, P., LACROIX, J. (1988). *Biología y fisiología celular: Cloroplastos, peroxisomas, división celular*. Ed. Omega. Barcelona.
- BERNAUER, U.; AMBERG, A.; SCHEUTZOW, D.; DEKANT, W. (1998). Biotransformation of 12C- and 2-13C-labeled methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-butyl alcohol in rats: identification of metabolites in urine by 13C nuclear magnetic resonance and gas chromatography/mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 651-658
- BLAKE, K.C.M. (1974). Absorption of 203 Pb from gastrointestinal tract of man. *Environ Res.* 2: 1-4.
- BLOOM, F.E. (1991). Alcohol and anesthetic actions: Are they mediated by lipid or protein?. En: *Neuropharmacology of ethanol. New approaches; 1-21*; Meyer; R. y cols. (eds). Birkhäuser.
- BOHMAN, M., CLONINGER, R., SIGVARDSSON, S. ; VON KNORRING, A.L. (1987). The genetics of alcoholisms and related disorders. *J. Psychiat. Res.* 21: 447-452.
- BOJA, J.W.; NIELSEN, J.A.; FOLDVARY, E.; TRUITT, E.B. (1985). Acute low-level formaldehyde behavioural and neurochemical toxicity in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 9: 671-674.
- BOOZE, R.M.; MACTUTUS, C.F. (1990). Developmental exposure to organic lead causes permanent hippocampal damage in Fischer-344 rats. *Experientia*, 46: 292-297.
- BORNSCHEIN, R.; PEARSON, D.; REITER, L. (1980). Behavioral effects of moderate lead exposure in children and animal models. *Animals studies. CRC Crit. Rev. Toxicol.* 8: 101-152.
- BRADFORD, B.U.; SEED, C.B. HANDLER, J.A.; FORMAN, D.T.; THURMAN, R.G. (1993). Evidence that catalase is a major pathway of ethanol oxidation in vivo: Dose-response studies in deer mice using methanol as a selective substrate. *Arch. Biochem. Biophysics*, 303: 172-176.

- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- BRESSLER, J.P.; GOLDSTEIN, G. W. (1991). Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 41: 479-484.
- BRIVET, I.; CHOMARD, PH.; DUMAS, P.; LALLEMANT, A.M.; THEVENIN, M. (1990) Ethanol-lead interaction in the Sprague-Dawley rat. *Food Additive Contaminants*, 7: 150-151.
- BRODDE, O.E.; BECKRINGH, J.J.; MICHEL, M.C. (1987). Human heart  $\beta$ -adrenoceptors: A fair comparison with lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptors?. *TIPS*, 8: 403-408.
- BROWN, Z.W; AMIT, Z.; LEVITAN, E.; ÖGREN, S-O.; SUTHERLAND, A. (1977). Noradrenergic mediation of the positive reinforcing properties of ethanol: II extinction of ethanol-drinking behavior in laboratory rats by inhibition of dopamine- $\beta$ -hydroxylase. Implications for treatment procedures in human alcoholics. *Arch. Int. Pharmacodynamie Thérapie*, 230: 76-82.
- BROWN, Z.W; AMIT, Z.; SMITH, B. (1979). Intraventricular self-administration of acetaldehyde but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology*, 64: 271-276 .
- BROWN, Z.W; AMIT, Z.; SMITH, B. (1980). Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats. *Behav. Neural Biol.* 28: 150-155.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (1989). *The Merck index*. Merck and Co., INc. USA.
- BURGER, J. (1990). Behavioral effects of early postnatal lead exposure in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35: 7-13.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. (1993). Lead and behavioral development in young herring gulls: effects of timing of exposure on individual recognition. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21: 187-195.
- BURKEY, R.T.; NATION, J.R. (1994). Brain stimulation reward following chronic lead exposure in rats. *Behav. Neurosci.* 108: 532-536.
- BURRIGHT, R.G.; ENGELLENER, W.J.; DONOVICK, P.J. (1989). Postpartum aggression and plasma prolactin levels in mice exposed to lead. *Physiol. Behav.* 46: 888-893.
- CALDERON, J. (1993). *El laboratorio de bioquímica clínica en el diagnóstico y seguimiento del Saturnismo*. U. Valencia.
- CAMJANOVICH, R.P.; MACINNES, J.W. (1973). Factors involved in ethanol narcosis: analysis in mice of three inbred strains. *Life Scienc.* 13: 55-65.
- CANDELA, S.; PICCININI, R.; VIAPPIANI, F.; LARI, U. (1991). Influence of alcohol on the behavior of dose and effect indicators in workers exposed to inorganic lead: unexpected behavior of ZPP. *Med. Lav.* 82: 533-541.
- CARDONA, E.; LESSLER, M.A. (1974). Time course of hematologic changes during chronic lead poisoning. *Proced. Soc. Esper. Biol. Med.* 145: 663-668.
- CARMICHAEL, F.J.; ISRAEL, Y.; CRAWFORD, M.; MINHAS, K.; SALDIVIA, V.; SANDRIN, S.; ORREGO H. (1991). Central nervous effects of acetate: Contribution to the central effects of ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 250: 403-408.

- CEZARD, C.; DEMARQUILLY, C.; BONIFACE, M.; HAGUENOER, J.M. (1992). Influence of the degree of exposure to lead on relations between alcohol consumption and the biological indices of lead exposure: epidemiological study in a lead acid battery factory. *British J. Industrial Med.* 49: 645-647.
- CHAKRABORTY, R.; DAS, A.; CERVERA, M.L.; DE LA GUARDIA, M. (1996). Determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave-assisted digestion of animal tissues and sewage sludges. *Fresenius J. Anal. Chem.* 355: 43-47.
- CHAO, H.M. (1995). Alcohol and the mystique of flushing. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19: 104-109.
- CHEN, Y.; YU, A.; SAARI, J.T.; KANG, J. (1997). Repression of hypoxia-reoxygenation injury in the catalase-overexpressing heart of transgenic mice. *P.S.E.B.M.* 216: 112-116.
- CHOIE, D.D.; RICHTER, G.W. (1980). Effects of lead on the kidney. In Singhal and Thomas (eds.) *Lead Toxicity*. 187-213. Baltimore.
- COHEN G.; SINET P.M.; HEIKKILA R. (1980). Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 4: 366-370.
- COHEN G.; SINET P.M.; HEIKKILA R. (1983). Ethanol oxidation by catalase in rat brain in vivo. *Res. Monographs*, 9: 311-315 .
- COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. (1996). A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J. Neurosci. Methods*, 67: 53-56.
- COLLINS, A.C; GILLIAM, D.M.; MINER, L. (1985). Indomethacin pretreatment blocks the effects of high concentration of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 9: 371-376.
- CORY-SLECHTA, D.; POKORA, M.J. (1991). Behavioral manifestations of prolonged lead exposure initiated at different stages of the life cycle: I. Schedule-controlled responding. *Neurotoxicology*, 12: 745-760.
- CRABBE, J.; BELKNAP, J.K. (1992). Genetic approaches to drug dependence. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 212-219.
- CRAMER, K. (1966). Predisposing factors for lead poisoning. *Acta Med. Scand. Suppl.* 445: 56-59.
- CROSS, A.; JONES, O.T.G. (1991). Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochimica Biophysica Acta*, 1057: 281-298.
- CULLEN, N.; CARLEN, P.L. (1992). Electrophysiological actions of acetate, a metabolite of ethanol, on hippocampal dentate granule neurons: interactions with adenosine. *Brain Res.* 588: 49-57.
- DABROWSKA-BOUTA, B.; STRUZYNSKA, L.; RAFALOWSKA, U. (1996). Does lead provoke the peroxidation process in rat brain synaptosomes?. *Mol. Chem. Neurophath.* 29: 127-139.
- DARNELL, J.E.; LODISH, H.F.; BALTIMORE, D. (1986). *Molecular cell biology*. Scientific American Books. New York.
- DAVID, O.; CLARK, J.; VOELLER, K. (1972). Lead and Hiperactivity. *Lancet*, 28: 900-903.
- DAVIS, S.F.; ARMSTRONG, S.L.W.; HUSS, M.T. (1993a). Shock-elicited aggression is influenced by lead and/or alcohol exposure. *Bull. Psychonomic Society.* 31: 451-453.

- DAVIS, S.F.; NATION, J.R.; MAYLEBEN, N.A. (1993c). The effects of chronic lead exposure on reactivity to frustrative nonreward in rats. *Toxicol. Lett.* 66: 237-246.
- DEGENNARO, L.D. (1987). The effects of lead nitrate on the central nervous system of the chick embryo. II. Electron microscopy and histochemistry: peroxisomes. *Growth*, 51: 213-223.
- DEITRICH, R.A. (1987). The specificity of ethanol. En: *Advances on biomedical alcohol research.*;131-138. Lindros, K.O (ed). Pergamon press.
- DEITRICH, R.A.; ERWIN, V.G. (1984). Interaction of amine metabolism and alcohol actions. En: *Monoamine oxidase and disease.* 275-289. Academic press.
- DEITRICH, R.A.; DUNWIDDIE, T.V.; HARRIS, A.; ERWIN, G. (1989). Mechanism of action of ethanol: Initial central nervous system actions. *Pharmacol. Rev.* 41: 489-537.
- DEMASTER, E.G.; REDFERN, B.; SHIROTA, F.N.; NAGASAWA, H.T. (1986). Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* 35: 2081-2085.
- DEMASTER, E.G.; SEVENS, J.M.; REDFERN, B. (1988). Ethanol oxidation by cumene hydroperoxide and hydrogen peroxide-supported peroxidatic activities of catalase. *Biochem. Arch.* 4: 319-327.
- DONALDSON, W.E.; KNOWLES, S.O. (1993). Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes?. *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 377-379.
- DONOVICK, P.J.; BURRIGHT, R.G. (1986). Short term lead exposure, age and food deprivation: Interactive effects on wheel running behavior of adult male mice. *Exp. Aging Res.* 12: 163-168.
- DRASKI, L.J.; DEITRICH, R.A. (1996). Initial effects of ethanol on the central nervous system. En: *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system;* 227-250; Deitrich, R.A.; Erwin, V.G. (eds.). CRC press.
- DUDEK, B.C.; FULLER, J.L. (1978). Task-dependent genetic influences on behavioral response of mice (*Mus musculus*) to acetaldehyde. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92: 749-758.
- DUDEK, B.C.; PHILLIPS, T.J. (1983). Locomotor stimulant and intoxicant properties of methanol, ethanol, tertiary butanol and pentobarbital in long-sleep and short-sleep mice. *Substance Alcohol Action/Misuse*, 4: 31-36.
- DUDEK, B.C.; TRITTO, T. (1994). Biometrical genetic analysis of ethanol's psychomotor stimulant effect. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18: 956-963.
- DUNWIDDIE, T.V.; DIAO, L.H. (1994). Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 537-545.
- ECKARD, M.J.; FILE, S.; GESSA, G.L.; GRANT, K.; GUERRI, C.; HOFFMAN, P.L.; KALANT, H.; KOOB, G.F.; LI, T.; TABAKOFF, B. (1998). Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 998-1040.
- ERIKSSON, C.J.P. ; DEITRICH, R.A. (1980). Evidence against a biphasic effect of acetaldehyde on voluntary ethanol consumption in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13: 291-296.
- ERWIN, V.G.; DEITRICH, R.A. (1996). Genetic selection and characterization of mouse lines for acute functional tolerance to ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 279: 1310-1317.

- ESCARABAJAL, D.; MIQUEL, M.; ARAGON, C.M.G. (1999). A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol's induced locomotor activity in mice. *J. Studies Alcohol*. (en prensa).
- EYSSERIC, H.; GONTHIER, A.; SOUBEYRAN, G.; BESSARD, R.; SAXOD, R.; BARRET, L. (1997). Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19: 1018-1023.
- FEINSTEIN, R.N.; HOWARD, J.B.; BRAUN, J.T.; SEAHOLM, J.E. (1966). Acatalasemic and hypocatalasemic mouse mutants. *Genetics*, 53: 923-933.
- FENTECAVA, F.; MANSUY, D.; JAOVEN, M.; PEZERAT, H. (1987). The stimulatory effects of asbestos on NADHP dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem. J.* 241: 561-565.
- FERGUSON, S.A.; BOWMAN, R.E. (1990). Effects of postnatal lead exposure on open field behavior in monkeys. *Neurotoxicol. Teratol.* 12: 91-7.
- FLORA, S. J. S.; TANDOM, S.K. (1987). Effect of combined exposure to lead and ethanol on some biochemical indices in the rat. *Biochemical Pharmacol.* 36: 537-541.
- FONIA, O.; WEIZMAN, R.; ZISMAN, E.; ASHKENAZI, R.; GAVISH, M. (1995). Down-regulation of hepatic peripheral-type benzodiazepine receptors caused by acute lead intoxication. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 293: 335-339.
- GEORGE, F.R.; GOLDBERG, S.R. (1989). Genetics approaches to the addiction processes. *TIPS*, 10: 78-83.
- GEORGE, F.R.; RITZ, M.C. (1991). Common mechanisms of reinforcement from alcohol and other drugs. *Alcohol Alcohol. Sup.1.* 427-431.
- GIANOULAKIS, C.; DEWAELE, J.P; THAVUNDAYIL, J. (1996). Implication of the endogenous opioid system in excessive ethanol consumption. *Alcohol*, 13: 19-23.
- GILL, K.; FRANCE, C.; AMIT, Z. (1986). Voluntary ethanol consumption in rats: an examination of blood/brain ethanol levels and behavior. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10: 457-462.
- GILL, K.; MENEZ, J.F.; LUCAS, D.; DEITRICH, R.A. (1992). Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16: 910-915.
- GILL, K.; AMIT, Z.; SMITH, B.R. (1996). The regulation of alcohol consumption in rats: The role of alcohol metabolizing enzymes-catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol*, 13: 347-353.
- GOLDSTEIN, D.B. (1987). Ethanol-induced adaptation in biological membranes. En: *Alcohol and the cell*; 103-112; Rubin, E. (ed). The New York Academy of Sciences.
- GOLDSTEIN, G.W. (1993). Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology*, 14: 97-101.
- GOLTER, M.; MICHAELSON, IA. (1975). Growth, behavior, and brain catecholamines in lead-exposed neonatal rats: a reappraisal. *Science*, 187: 359-361.

- GONGWER, M. A.; MURPHY, J. M.; MCBRIDE, W.J.; LUMENG, L.; LI, T.K. (1989). Regional brain contents of serotonin, dopamin, and their metabolites in the selectively bred high- and low- alcohol drinking lines of rats. *Alcohol*, 6: 317-321.
- GOYER, R.A. (1993). Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect.* 100: 177-187.
- GROVER, C.A.; NATION, J.R.; BRATTON, G.R. (1993a). Chronic exposure to lead attenuates cocaine-induced behavioral activation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 221-225.
- GROVER, C.A.; NATION, J.R.; BURKEY, R.T.; McCLOURE, M.C.; BRATTON, G.R. (1993b). Lead/ethanol interactions I: Rate-depressant effects. *Alcohol*, 10: 355-361.
- GROVER, C.A.; FRYE, G.D. (1996). Ethanol effects on synaptic neurotransmission and tetanus-induced synaptic plasticity in hippocampal slices of chronic in vivo lead-exposed adult rats. *Brain Res.* 734: 61-71.
- GRUPP, L.A. (1991). The renin-angiotensin system: A multidimensional source of control over alcohol consumption. En: *Advances on biomedical alcohol research.*; 421-426; Kalant, H y cols. (eds). Pergamon press.
- HAHN, M.E.; BURRIGHT, R.G.; DONOVICK, P.J. (1991). Lead effects on food competition and predatory aggression in binghamton HET mice. *Physiology Behav.* 50: 757-764.
- HAMBY-MASON, R.; CHEN, J.J.; SCHENKER, S.; PÉREZ, A.; HENDERSON, G.I. (1997). Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21: 1063-1072.
- HANDLER, J.A.; THURMAN, R.G. (1985). Fatty acid-dependent ethanol metabolism. *Biochem. Biophysical Res. Com.* 133: 44-51.
- HANDLER, J.A.; THURMAN, R.G. (1990). Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *J. Biological Chemistry*, 265: 1510-1515.
- HAYAKAWA, K. (1971). Microdetermination and dynamic aspects of in vivo alkyl lead compounds. *Jpn. J. Hyg.* 26: 377-385.
- HEAP, L.; WARD, R.J.; ABIKA, C.; DEXTER, D.; LAWLOR, M.; PRATT, O.; THOMSON, A.; SHAW, K.; PETERS, T.J. (1995). The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem. Pharmacol.* 50: 263-270.
- HEIM, W.G.; APPLEMAN, D.; PYFROM, H.T. (1955). Production of catalase changes in animals with 3-amino-1, 2, 4-triazole. *Science*, 122: 693.
- HEIM, W.G.; APPLEMAN, D.; PYFROM, H.T. (1956). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT) on catalase and another compounds. *American J. Physiology*, 19: 23.
- HEINZEL, B.; JOHN, M.; KLATT, P.; BOHME, E.; MAYER, B. (1992). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 281: 627-630.
- HERMES-LIMA, M.; VALLE, V.G.; VERCESI, A.E.; BECHARA, E.J. (1991). Damage to rat liver mitochondria promoted by delta-aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species:



- connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta*, 1056: 57-63.
- HERZ, A. (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129: 99-111.
- HIRATA, M.; KOSAKA, H. (1993). Effects of lead exposure on neurophysiological parameters. *Environ. Res.* 63: 60-69.
- HO, K.S.; TSAI, C.S. (1975). Neurochemical correlates of ethanol preference in inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3: 1073-1076.
- HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. (1996). Alcohol dependence: A commentary on mechanisms. *Alcohol Alcohol.* 31: 333-340.
- HRDINA, P.D.; PETERS, D.A.; SINGHAL, R.L. (1976). Effects of chronic exposure to cadmium, lead and mercury of brain biogenic amines in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 15: 483-493.
- HOLTZMAN, S.G.; SCHNEIDER, F.H. (1974). Comparison of acetaldehyde and ethanol: Depression of motor activity in mice. *Life Scienc.* 14: 1243-1250.
- HUNT, T.; AMIT, Z. (1987). Conditioned taste aversion induced by self administered drugs: paradox revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 11: 107-130.
- HUNT, W.A. (1985). *Alcohol and biological membranes*. The Guilford press.
- HUNT, W.A. (1993). Neuroscience research: How has it contributed to our understanding of alcohol abuse and alcoholism? A review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 1055-1065.
- HUNT, W.A. (1996). Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review. *Alcohol*, 13: 147-151.
- IMPERATO, A.; DI CHIARA, G. (1986). Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239: 219-228.
- ISHII, H.; SUGA, T.; NIINOBE, S. (1977). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on lipid metabolism in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1438-1440.
- ISRAEL, Y.; ORREGO, H.; CARMICHAEL, F.J. (1994). Acetate-mediated effects of ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18: 144-148.
- ITO, D.; LIEBER, C.S. (1993). Ethanol metabolism in deermice: role of extrahepatic alcohol dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 919-925.
- JACKSON, H.C.; KITCHEN, I. (1990). Lack of effect of perinatal lead exposure on kappa-opioid receptor function. *Toxicol. Lett.* 50: 17-23.
- JASON, K.M.; KELLOGG, C.K. (1980). Behavioral neurotoxicity of lead. En: *Lead Toxicity*. Singhal y Thomas (eds). Baltimore.
- JENNET, R.B.; SORRELL, M.F.; SAFFARI-FARD, A.; OCKNER, J.L.; TUMA, D.J. (1989). Preferential covalent binding of acetaldehyde to the  $\alpha$ -chain of purified rat liver tubulin. *Hepatology*, 9: 57-62.

- JONES, D.P.; THOR, H.; ANDERSSON, B.; ORRENIUS, S. (1978). Detoxification reactions in isolated hepatocytes: Role of glutathione peroxidase, catalase and formaldehyde dehydrogenase in reactions relating to N-demethylation by the cytochrome P450 system. *J. Biol. Chem.* 253: 6031-6037.
- KATNER, S.N., KERR, T.M.; WEISS, F. (1996). Ethanol anticipation enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) but not wistar rats. *Behav. Pharmacol.* 7: 669-674.
- KELLEY, A.E. (1993). Locomotor activity and exploration. En: *Behavioural Neuroscience: A practical approach*. Sahgal Ed.
- KENNEY, W.C. (1980). Interaction of acetaldehyde with phospholipids. *Gastroenterology*, 79: 1030-3032.
- KITCHEN, I.; KELLY, M. (1993). Effect of perinatal lead treatment on morphine dependence in the adult rat. *Neurotoxicology*, 14: 125-129.
- KIYATKIN, E.A. (1995). Functional significance of mesolimbic dopamine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19: 573-598.
- KLEMM, W.R.; BOYLES, R.; MATHEW, J.; CHERIAN, L. (1988). Gangliosides, or sialic acid, antagonize ethanol intoxication. *Neurochem. Int.* 13: 275-300.
- KOECHLING, U.M.; AMIT, Z. (1992). A relationship between blood catalase and drinking history in a human population: A possible biological marker of the affinity to consume alcohol. *Alcohol Alcohol.* 27: 181-188.
- KOECHLING, U.M.; AMIT, Z. (1994). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on brain catalase in the mediation of ethanol consumption in mice. *Alcohol*, 11: 235-239.
- KOECHLING, U.M.; AMIT, Z.; NEGRETE, J.C. (1995). Family history of alcoholism and the mediation of alcohol intake by catalase: Further Evidence for catalase as a marker of the propensity to ingest alcohol. *Alcoholism: Clin., Exp. Res.* 19: 1096-1104.
- KOOB, G. F.; GOEDERS, N. E. (1989). Neuroanatomical basis of drug self-administration. En: *Neuropharmacological Basis of Reward*. J. M. Liebman ; S. J. Cooper (eds). 214-263. Oxford; Clarendon.
- KOSTOWSKI, W.; BIENKOWSKI, P. (1999). Discriminative stimulus effects of ethanol: Neuropharmacological characterization. *Alcohol*, 17: 63-80.
- KURIYAMA, S.; OKUMA, S.; TOMONO, S.; HIROUCHI, M. (1987). Effects of alcohol and acetaldehyde on metabolism and function of neurotransmitter systems in cerebral cortical neurons in primary culture. *Alcohol Alcohol.* 1 spl.: 685-689.
- LANDS, W.E.M. (1998). A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 15: 147-160.
- LEJOYEUX, M. (1996). Use of serotonin (5-hydroxytryptamine) reuptake inhibitors in the treatment of alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 31: 69-75.
- LESLEY, S. M.; GREENLAND, R. D.; MINNEMA, D. J.; MICHALESON, I. A. (1984). Influence of chronic lead exposure on regional dopamine and 5-HT turnover in rat brain. *Neurochem. Res.* 9: 1671-1684.

- LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. (1970). Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. *J. Biol. Chem.* 245: 2505-2512.
- LINDROS, K.O. (1978). Acetaldehyde: its metabolism and role in the actions of alcohol. En: *Research advances in alcohol and drug problems*. 111-176. Israel, Y. y cols., (eds). Plenum. NY.
- LINDROS, K.O.; HILLBOM, M.E. (1979). Acetaldehyde in cerebrospinal fluid: Its near-absence in ethanol-intoxicated alcoholics. *Medical Biol.* 57: 246-247.
- LUMENG, L.; LIN, R.C. (1992). Protein acetaldehyde adducts as biochemical markers of alcohol consumption. En: *Measuring alcohol consumption*. 161-182; Litten, R. (ed). The Humana press Inc.
- MACDONALD, E. ; PISPA, J. (1980). Inhibition of catalase in vitro and in vivo by 4-hydroxypyrazole, a metabolite of pyrazole. *Febs Lett.* 120: 61-63.
- MAGID, E.; HILDEN, M. (1975). Elevated levels of blood lead in alcoholic liver disease. *Int Arch. Occup. Health*, 35: 61-65.
- MAHAFFEY, K.R.; GOYER, R.A.; WILSON, M.H. (1974). Influence of ethanol ingestion on lead toxicity in rats fed isocaloric diets. *Arch. Environ. Health*, 28: 217-222.
- MANCILLAS, J. R.; SIGGINS, G. R.; BLOOM, F. E. (1986). Systemic ethanol selective enhancement of responses to acetylcholine and somatostatin in hippocampus. *Science*, 231: 161-163.
- MCBRIDE, W.J., MURPHY, J.M. GATTO, G.J. (1991). Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake. *Alcohol Alcohol. suppl.1*: 411-416.
- MCKENNA, O.; ARNOLD, G.; HOLTZMAN, E. (1976). Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 117: 181-194.
- MINIUK, K.; MONIUZSKO-JAKONIUK, J.; KULIKOWSKA, E.; OMIELJANIUK, N. (1989). The interaction of copper, lead and ethanol in rats: effects on some biochemical parameters of blood. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 41: 273-280.
- MISSALE C.; BATTAINI F.; GOVONI S.; CASTELLETTI L.; SPANO P.; TRABUCCHI M. (1984). Chronic lead exposure differentially affects dopamine transport in rat striatum and nucleus accumbens. *Toxicology*, 33: 81-90.
- MONTOLIU, C.; VALLES, S.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. (1994). Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J. Neurochem.* 63: 1855-1862.
- MOORE, T.O.; JUNE, H.L.; LEWIS, M.J. (1993). Ethanol-induced stimulation and depression on measures of locomotor activity levels in rats. *Alcohol*, 10: 537-540.
- MORENO, S.; MUGNAINI, E.; CERU, M.P. (1995). Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of rat. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 1253-1267.
- MORENO, S.; NARDACCI, R.; CERU, M.P. (1997). Regional and ultrastructural immunolocalization of copper-zinc superoxide dismutase in rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 1611-1622.

- MORROW, A.L.; SUZDAK, P.D.; KARANIAN, J.W.; PAUL, S.M. (1988). Chronic ethanol administration alters g-aminobutyric acid, pentobarbital and ethanol-mediated <sup>36</sup>Cl- uptake in cerebral cortical synaptoneuroosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 158-164.
- MYERS, R.D. (1994). New drugs for the treatment of experimental alcoholism. *Alcohol*, 11: 439-451.
- MYERS, R.D. (1995). Tetrahydroisoquinolines and alcoholism: Were are we today?. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20: 3.
- MYERS, R.D.; VEALE, W.L. (1969). Alterations in volitional alcohol intake produced in rats by chronic intraventricular infusions of acetaldehyde, paraldehyde or methanol. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 180: 100-113.
- MYERS, W.D.; NG, K; SINGER, G. (1982). Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rat as a functions of schedule, food deprivation and photoperiod. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 807-811.
- MYERS, W.D.; NG, K; SINGER, G. (1984a). Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration. *Experientia*, 40: 1008-1010.
- MYERS, W.D.; NG, K; SINGER, G. (1984b). Effects of naloxone and buprenorphine on intravenous acetaldehyde self-injection in rats. *Physiol. Behav.* 33: 807-811.
- MYERS, W.D.; NG, K; SINGER, G; SMYTHE, G.A. DUNCAN, M.W. (1985). Dopamine and salsolinol levels in the rat hypothalamus and striatum after schedule-induced self injection (SISI) of ethanol and acetaldehyde. *Brain Res.* 358: 122-128.
- NAGY, L.E.; DIAMOND, I.; CASSO, D.J.; FRANKLIN C.; GORDON, A.S. (1990). Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J. Biol. Chem.* 265: 1946-1951.
- NATION, J.R.; CLARK, D.E.; BOURGEOIS, A.E.; ROGERS, J.K. (1982). Conditioned suppression in the adult rat following chronic exposure to lead. *Toxicol. Lett.* 14: 63-67.
- NATION, J.R.; BAKER, D.M. ; TAYLOR, B. (1986). Dietary lead increases ethanol consumption in the rat. *Behav. Neurosci.* 4: 525-530.
- NATION, J.R.; BAKER, D.M.; FANTASIA, M.A.; RUSCHER, A.E.; CLARK, D.E. (1987). Ethanol consumption and free operant avoidance performance following exposure to dietary lead. *Neurotoxicology*, 8: 561-568.
- NATION, J.R.; DUGGER, L.M.; DWYER, K.K.; BRATTON, G.R.; GROVER, C.A. (1991a). The effects of dietary lead on ethanol-reinforced responding. *Alcohol Alcohol.* 26: 473-480.
- NATION, J.R.; GROVER, C.A. y BRATTON, G.R. (1991b). Lead attenuates the antipunishment effects of ethanol. *Alcohol*, 8: 1-5.
- NATION, J.R.; BURKEY, R.T.; GROVER, C.A. (1993). Lead/ethanol interactions II: Pharmacokinetics. *Alcohol*, 10: 363-367.
- NELSON, B.K.; MOORMAN, W.J.; SCHRADER, S.M.; SHAW, P.B.; KRIEG, E.F. (1997). Paternal exposure of rabbits to lead: Behavioral deficits in offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 19: 191-198.

- NESTLER, E.J.; BERHOW, M.T.; BRODKIN, E.S. (1996). Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways. *Mol. Psychiatry*, 1: 190-199.
- NORRIS, P.J.; HARDWICK, J.P.; EMSON, P.C. (1994). Localization of NADPH cytochrome P450 oxidoreductase in rat brain by immunohistochemistry and *in situ* hybridation and a comparison with the distribution of neuronal NADPH-diaphorase staining. *Neuroscience*, 61: 331-350.
- NUÑEZ-VERGARA, L.J.; YUDELEVICH, J.A.; SQUELLA, J.A.; SPEISKY, H. (1991). Acetaldehyde interactions during ethanol metabolism *in vitro*. *Alcohol Alcohol*. 26 ; 139-146.
- OHAWAN, M.; FLORA, S.J.; SINGH, S.; TANDON S.K. (1989). Chelation of lead during co-exposure to ethanol. *Biochem. Int.* 9: 1067-75.
- OLLAT, H.; PARVEZ, H.; PARVEZ, S. (1988). Alcohol and central neurotransmission. *Neurochem. Int.* 13: 275-300.
- ORTIZ, A.; GRIFFITHS, P.J.; LITTLETON, J.M. (1974). A comparison of the effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice: Evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence. *J. Pharmacy Pharmacol.* 6: 349-260.
- ORTIZ, J.; FITZGERALD, L.W.; CHARLTON, M.; LANE, S.; TREVISAN, L.; GUITART, X.; SHOEMAKER, W.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. (1995). Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse*, 21: 289-299.
- PANES, J.; CABALLERIA, J.; GUITART, R.; PARES, A.; SOLER, X.; RODAMILANS, M.; NAVASA, M.; PARES, X.; BOSCH, J.; RODES, J. (1993). Determinants of ethanol and acetaldehyde metabolism in chronic alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 48-53.
- PAROD, R.J.; DOLGIN, J.G. (1993). Manejo de las intoxicaciones agudas. En: *Farmacología*. Smith C.M.; Reynard, A.M. (eds). Ed. Médica Panamericana. Madrid.
- PASTORIC, M.; BOYADJIEVA, N.; SARKAR, D.K. (1994). Comparison of the effects of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and  $\beta$ -endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures. *Mol. Cel. Neurosci.* 5: 580-586.
- PETERSEN, D.R; ERWIN, V.G; DEITRICH, R:A. (1983). Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. *Res. Monographs*, 9: 93-99.
- PHILLIPS, J.W.; O'REGAN, M.H.; PERKINS, L.M. (1992). Actions of ethanol and acetate on rat cortical neurons: ethanol/adenosine interactions. *Alcohol*, 9: 541-546.
- PHILLIPS, T. J.; CRABBE, J. C. (1991). Behavioral studies of genetic differences in alcohol action. 25-104. En: *The genetic basis of alcohol and drug actions*. Crabbe, J. C. ; Harris, R. A. (eds). Plenum Press. New York.
- PHILLIPS, T.J.; FELLER, D.J.; CRABBE, J.C. (1989). Selected mouse lines, alcohol and behavior. *Experientia*, 45: 805-827.
- PISPA, J. P.; MACDONALD, E. (1980). Inhibition of dopamine-b-hydroxylase by a metabolite of pyrazole, 4-hydroxypyrazole *in vitro*. *FEBS Lett.* 120: 64-66.
- POET, T.S.; VALENTINE, J.L.; BORGHOFF, S.J. (1997). Pharmacokinetics of tertiary butyl alcohol in male and female Fischer 344 rats. *Toxicol Lett.* 92:179-186.

- POHORECKY, L.A. (1977). Biphasic action of ethanol. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1: 231-240.
- POKORA, M.J.; RICHFIELD, E.K.; CORY-SHELTA, D.A. (1996). Preferential vulnerability of nucleus accumbens dopamine binding sites to low-level lead exposure: Time course of effects and interactions with chronic dopamine agonist treatments. *J. Neurochem.* 67: 1540-1550.
- POLDRUGO, F.; SNEAD, O.C. (1985). Effect of ethanol and acetaldehyde on gamma-hydroxybutyric acid in rat brain and liver. *Subs. Alcohol Actions/Misuse*, 5: 263-271.
- PRAT, A.G.; TURRENS, J.F. (1990). Ascorbate- and hemoglobin-dependent brain chemiluminescence. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 319-325.
- PROTCOR, W.R.; DUNWIDDIE, T.W. (1984). Behavioural sensitivity to purinergic drugs parallels ethanol sensitivity in selectively bred mice. *Science*, 224: 519-521.
- PULVIRENTI, L.; KASTIN, A.J. (1988). Naloxone, but not Tyr-MIF-1, reduces volitional ethanol drinking in rats: correlation with degree of spontaneous preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31: 129-134.
- PULVIRENTI, L.; KOOB, G.F. (1994). Dopamine receptor agonist, partial agonists and psychostimulant addiction. *TIPS*, 15: 374-379.
- QUINTANILLA, M.E.; TAMPIER, L.; MARDONES, J. (1980). Influence of 3-amino-1,2,4-triazole on paraldehyde and pentobarbital induced narcosis in rats. *ICRS Med. Sci.* 8: 35.
- RABIN, R.; MOLINOFF, P.B. (1981). Activation of adenylate cyclase by ethanol in mouse striatal tissue. *J. Pharmacol. Exp. Therapy*, 216: 129-134.
- RABINOWITZ, M.B.; WETHERILL, G.W.; KOPPLE, J.D. (1973). Lead metabolism in the normal human; stable isotope studies. *Science*, 182: 725-727.
- RABINOWITZ, M.B.; WETHERILL, G.W.; KOPPLE, J.D. (1976). Kinetic metabolism in healthy humans. *J. Clin. Invest.* 58: 260-270.
- RAFALES, L.S.; BORNSCHEIN, R.L.; MICHAELSON, I.A.; LOCH, R.K.; BARKER, G.F. (1979). Drug induced activity in lead-exposed mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10: 95-104.
- RASKIN, N.H.; SOKOLOFF, L. (1972). Enzymes catalyzing ethanol metabolism in neural and somatic tissues of the rat. *J. Neurochem.* 19: 273-282.
- REDDY, B.V.; SARKAR, D.K. (1993). Effect of alcohol, acetaldehyde and salsolinol on  $\beta$ -endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 161-1267.
- REDDY, B.V.; BOYADJEVA, N.; SARKAR, D.K. (1995). Effect of ethanol, propanol, butanol and catalase enzyme blockers on  $\beta$ -endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: Evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of  $\beta$ -endorphin release. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* 19: 339-344.
- REZVANI, A.H.; OVERSTRET, D.H.; JANOWSKY, D.S. (1991). Drug-induced reductions in ethanol intake in alcohol preferring and fawn-hooded rats. *Alcohol. Alcohol. sup.* 1: 433-437.
- ROMMELSPACHER, H.; BUCHAU, C.; WEISS, J. (1987). Harman induces preference for ethanol in rats: Is the effect specific for ethanol?. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 749-755.

- ROSSI, E.; TAKETANI, S.; GARCIA-WEBB, P. (1993). Lead and the terminal mitochondrial enzymes of haem biosynthesis. *Biomed. Chromatogr.* 7: 1-6.
- ROSSOUW, J.; OFFERMEIER, J.; VAN ROOYEN, J.M. (1987). Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 132-139.
- ROTZINGER, S.; SMITH, B. R.; AMIT, Z. (1994). Catalase inhibition attenuates the acquisition of ethanol and saccharin-quinine consumption in laboratory rats. *Behav. Pharmacol.* 5: 203-209.
- ROTZINGER, S.; ARAGON, C.M.G.; ROGAN, F.; AMIR, S.; AMIT, Z. (1995). The nitric oxide synthase inhibitor N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methylester attenuates brain catalase activity in vitro. *Life Sci.* 56: 1321-1324.
- ROUT, U.K. (1992). Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. *Alcoholism: Clin. Exper. Res.* 16: 286-289.
- SANCHIS-SEGURA, C.; MIQUEL, M.; CORREA, M.; ARAGÓN, C.M.G. (1999). The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. *Alcohol.* (en prensa).
- SANCHIS-SEGURA, C.; MIQUEL, M.; CORREA, M.; ARAGÓN, C.M.G. (1999). Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: Is there a functional link?. *Psychopharmacol.* (en prensa).
- SANDHIR, R.; JULKA, D.; GILL, K. D. (1994). Lipidoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.* 74: 66-71.
- SAUERHOFF, M.W.; MICHAELSON, I.A. (1973) Hyperactivity and brain catecholamines in lead-exposed developing rats. *Science*, 182: 1022-1024.
- SCANDALIOS, J.G. (1997). Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. *Oxidative Stress Mol. Biol. Antiox. Defenses*, 1: 527-566.
- SCANDALIOS, J.G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A.N. (1997). Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation, and expression. *Oxidative Stress Mol. Biol. Antiox. Defenses*, 1: 343-406.
- SHARPER A.G.; POCOCK S.J.; WALDER M.; WALE C.J.; CLATON B.; DEVELS H.T.; HINKS L. (1982). Effects of alcohol and smoking on blood lead in middle-age british men. *British Med. J.* 284: 299-302
- SHIOHARA, E.; TSUKADA, M.; CHIBA, S.; YAMAZAKI, H.; NISHIGUCHI, K.; MIYAMOTO, R.; NAKANISHI, S. (1986). Effect of chronic administration of acetaldehyde by inhalation (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-activated adenosine triphosphatase activity of rat brain membranes. *Toxicology*, 34: 277-284.
- SILBERGELD, E.K.; GOLDBERG, A.M. (1974). Lead-induced behavioral dysfunction: an animal model of hiperactivity. *Exp. Neurol.* 42:146-157.
- SILBERGELD, E.K.; HRUSKO, R.E.; MILLER, L.P.; ENG, N. (1980). Effects of lead in vivo and in vitro on GABAergic neurochemistry. *J. Neurochem.* 34: 1712-1718.
- SIMONS, T.J. (1993). Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology*, 14: 77-85.
- SINGH, A.K. (1993). Effects of chronic low-level lead exposure on mRNA expression, ADP-ribosylation and photoaffinity labeling with (alpha-32P) guanine triphosphate-gamma-azidoanilide of GTP-

- binding proteins in neurons isolated from the brain of neonatal and adult rats. *Biochem. Pharmacol.* 9: 1107-1114.
- SLATER T.S. (1984). Free radicals mechanism in tissue injure. *Biochem Int.* 222: 1-15.
- SMITH, B.R; AMIT, Z.; SPLAWINSKY, J. (1984). Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol*, 1: 193-195.
- SMITH, B.R; AMIT, Z. ARAGON, C.M.G. SOCARANSKY, S.M. (1985a). Neurobiological correlates of ethanol self-administration: The role of acetaldehyde. 45-63. En: *Research advances in new psychopharmacological treatments of alcoholism*. Naranjo, C.A ; Sellers, E.M . (eds). Elsevier.
- SMITH, B.R.; ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1985b). A time-dependent biphasic effect of an acute ethanol injection on 3-methoxy 4-hydroxyphenylethylene glycol sulfate in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 34: 1311-1314.
- SMITH, B.R.; ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1997). Catalase and the production of central acetaldehyde: A possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addict. Biol.* 2: 277-289.
- SMOLEN, T.N.; COLLINS, A.C. (1984). Behavioral effects of ethanol and salsolinol in mice selectively bred for acute sensivity to ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20: 281-28 .
- SOCARANSKY, S.M.; ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z.; BLANDER, A. (1984). Higher correlation of ethanol consumption with brain than liver aldehyde dehydrogenase in three strains of rats. *Psychopharmacology*, 84: 250-254.
- SOCARANSKY, S.M.; ARAGON, C.M.G.; AMIT, Z. (1985). Brain ALDH as a possible modulator of ethanol intake. *Alcohol*, 2: 361-365.
- SOMASHEKARIAH, B.V.; PADMAJA K.; PRASAD A.R.K. (1992). Lead-Induced lipid peroxidation and antioxidant defense components of developing chick embryos. *Free Radical Biol. Med.* 13: 107-114.
- SRIVASTA R.C.; KUMAR A.; SRIVASTA S.K.; GUPTA S.; HASAN S.K.; ATHAR M. (1990). Nickel mediated inhibition in glutathione dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Int.* 20: 495-501.
- SUGAWARA E.; NAKAMURA K.; MIYAKE T; FUKUMURA A.; SEKI Y. (1991). Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. *British J. Indus. Med.* 48: 239-242.
- SWARTZWELDER, H. S. (1984). Altered responsiveness to alcohol after exposure to organic lead. *Alcohol*, 1. 181-183.
- TABAKOFF, B., ANDERSON, R. A.; RITZMANN, R. F. (1976). Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1305-1309.
- TABAKOFF, B.; HOFFMAN, P. L. (1987). Biochemical pharmacology of alcohol. *Alcohol*, 7: 1521-1526.



- TABAKOFF, B.; RABE, C.S.; GRANT, K.A.; VALERIUS, P.; HUDSPITH, M.; HOFFMAN, P. (1991). Ethanol and the NMDA receptor: Insights into ethanol pharmacology. 1-21. En: Neuropharmacology of ethanol. New approaches. Meyer, R. (ed). Birkhäuser.
- TAKAYAMA, S.; UYENO, E.T. (1985). Intravenous self administration of ethanol and acetaldehyde by rats. Japanese J. Psychopharmacol. 5: 329-334.
- TAMPIER, L.; MARDONES, J. (1979). Catalase mediated oxidation of ethanol by rat brain homogenates. IRCS Med. Sci, 7: 389.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; MARDONES, J. (1980). Methanol, ethanol and acetaldehyde oxidation rates by homogenates of different brain regions of UChA and UChB rats. IRCS Med. Sci, 8: 157-158.
- TAMPIER, L.; MARDONES, J. (1986). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on ethanol blood levels after intraperitoneal administration. Alcohol, 3: 181-183.
- TAMPIER, L.; MARDONES, J. (1987). Absence of effect of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on blood ethanol levels after oral administration in rats. Alcohol, 4: 73-74.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; LETELIER, C.; MARDONES, J. (1988). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on narcosis time and lethality of ethanol in UCHA rats. Alcohol, 5: 5-8.
- TAMPIER, L.; QUINTANILLA, M.E.; MARDONES, J. (1994). Effects of aminotriazole on ethanol water, and food intake and on brain catalase in UCHA and UCHB rats. Alcohol, 12: 31-344.
- TANDOM, S.K.; FLORA, S.J. (1989). Dose and time effects of combined exposure to lead and ethanol on lead body burden and some neuronal, hepatic and hematopoietic biochemical indices in the rat. J. Appl. Toxicol. 9: 347-352.
- TECHSKE, R.; HASUURA, Y.; LIEBER, C.S. (1976). Hepatic ethanol metabolism: Respectives roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol-oxidizing enzymes system and catalase. Arch. Biochem. Biophysics, 175: 635-643.
- TERENIUS, L. (1996). Alcohol addiction (Alcoholism) and the opioid system 1. Alcohol, 13: 31-34.
- THADANI, P. V.; TRUITT, E. B. (1977). Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinephrine in rat brain. Biochem. Pharmacol. 26: 1147-1150.
- THURMAN, R. G.; HANDLER, J. A. (1989). New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. Drug Metab. Rev. 20: 679-688.
- TICKU, M. K.; KULKARNI, S. K. (1988). Molecular interactions of ethanol with GABAergic system and potential of RO15-4513 as an ethanol antagonist. Pharmacol. Biochem. Behav. 30: 501-510.
- TRAMILL, J.L.; TURNER, P.E.; HARWELL, G. (1981). Alcoholic hypoglycemia as a result of acute challenges of ethanol. Physiological Psychol 9: 114-116.
- TRUITT, E.B.; WALSH, M.J. (1971). The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. En: The biology of alcoholism, vol.1. 161-195. Kissin, B.; Begleiter, H. (eds.) New York: Plenum Press.

- TUOMISTO, L.; AIRAKSINEN, M.; PEURA, P.; ERIKSSON, C.J.P. (1982). Alcohol drinking in the rat: Increases following intracerebroventricular treatment with tetrahydro- $\beta$ -carboline. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 831-836.
- TURINI, A.; AMATO, G.; LONGO, V.; GERVASI, PG. (1998). Oxidation of methyl- and ethyl-tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms. *Arch. Toxicol.* 72: 207-214.
- VALENZUELA, A.,; LEFAUCONNIER, J.; CHAUDIERE, J.; BOURRE, J. (1989). Effects of lead acetate on cerebral glutathione peroxidase and catalase in the suckling rat. *Neurotoxicology*, 10: 63-70.
- VAN REE, J.M. (1996). Endorphins and experimental addiction 1. *Alcohol*, 13: 25-30.
- VIVES, JF.; LAPINSKI, H. (1980). Alcoholism chronique et intoxication saturnine. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 4: 119-122.
- WALSH, M.J. (1971). Role of acetaldehyde in the interactions of ethanol with neuroamines, 233-266. En: *Biochemical aspects of alcohol*; Roach, M.K. et al. (eds). University of Texas Press.
- WEISS, F.; KOOB, G.F. (1991). Neuropharmacology of ethanol, 125-151. En: *Neuropharmacology of ethanol. New approaches*. Meyer, R. y cols. (ed). Birkhäuser.
- WILSON, J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 1149-1163.
- WISE, R.A.; ROMPRE, P.P. (1989). Brain dopamine and reward. *Ann. Rev. Psychol.* 40: 191-225.
- WOODROW, K. M.; ELTHERINGTON, L. G. (1988). Feeling no pain: alcohol as an analgesic. *Pain*, 32: 159-163.
- YANG, Q.; DE PIERRE, J.W. (1998). Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression Purification.* 12: 277-283.
- YANG, T.; JIANG, X.; ZHANG, H.J.; LI, S.; OBERLEY, L.W. (1998). Use of commercial antibodies for detection of the primary antioxidant enzymes. *Free Radical Biol. Med.* 6: 688-693.
- YORK, J.L.; CHAN, A.W.K. (1993). Age-related differences in sensitivity to alcohol in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 864-869.
- YOSHIMOTO, K.; MCBRIDE, W.; LUMENG, L.; LI, T. (1992). Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol* 16: 781-785.
- YOSHIMOTO, K.; KOMURA, S. (1993). Monitoring of ethanol levels in the rat nucleus accumbens by brain microdialysis. *Alcohol* 28: 171-174.
- ZAJAC, C.S.; ABEL, E.L. (1990). Lack of lead effects on fetal development and offspring learning when combined with alcohol in the Long-Evans rat. *Teratology*, 41: 33-41.
- ZENICK, H.; GOLDSMITH, M. (1981). Drug discrimination learning in lead-exposed rats. *Science*, 212: 569-571.
- ZIMATKIN, S.M. (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J. Neurochem.* 56: 1-11.

- ZIMATKIN, S.M.; DEITRICH, R.A. (1995). Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19: 1300-1306.
- ZIMATKIN, S.M.; LINDROS, K.O. (1996). Distribution of catalase in rat brain: Aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol.* 31: 167-174.
- ZIMATKIN, S.M.; DEITRICH, R.A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biol.* 2: 387-399.
- ZIMATKIN, S.M.; LIOPO, A.V.; DEITRICH, R.A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 1623-1627