



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE HUMANIDADES Y CIENCIAS DE  
LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA BÁSICA,  
CLÍNICA Y PSICOBIOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS  
CONDUCTAS INDUCIDAS POR EL ALCOHOL:  
EL PAPEL DE LOS ENZIMAS CEREBRALES  
RESPONSABLES DE METABOLISMO DEL  
ACETALDEHIDO**

**PRESENTADA POR:  
M<sup>a</sup> DOLORES ESCARABAJAL ARRIETA**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. CARLOS M. GONZÁLEZ ARAGÓN**

**JAÉN, 8 DE MAYO DE 2000**

**ISBN 84-8439-047-0**



**MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONDUCTAS INDUCIDAS POR EL  
ALCOHOL: EL PAPEL DE LOS ENZIMAS CEREBRALES RESPONSABLES DEL  
METABOLISMO DEL ACETALDEHÍDO**

**Escarabajal Arrieta**

**M<sup>a</sup> Dolores**

**I.S.B.N** 84-8439-047-0

**Centro** Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

**Departamento** Psicología Básica, Clínica y Psicobiología





## **Nombre y apellidos del autor**

---

Apellidos **ESCARABAJAL ARRIETA**

Nombre **M<sup>a</sup> DOLORES**

## **Título de la Tesis Doctoral**

---

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONDUCTAS INDUCIDAS  
POR EL ALCOHOL: EL PAPEL DE LOS ENZIMAS CEREBRALES  
RESPONSABLES DEL METABOLISMO DEL ACETALDEHÍDO**

## **Fecha de lectura**

---

**8 DE MAYO DE 2000**

## **Centro y Departamento en que fue realizada la lectura**

---

Centro **Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación**

Departamento **Psicología Básica, Clínica y Psicobiología**

## **Composición del Tribunal / Dirección de la tesis**

---

Dirección de la Tesis **Dr. D. Carlos M. González Aragón**

Presidente/a del Tribunal **Dr. D. Vicent Simón Pérez**

Vocales

**Dra. D<sup>a</sup> Carmen Torres Bares**

**Dr. D. Emilio Ambrosio Flores**

**Dr. D. Miguel Sánchez Turet**

Secretario/a **Dra. D<sup>a</sup> Marta Miquel Salgado-Araujo**

## **Calificación obtenida**

---

**SOBRESALIENTE CUM LAUDE POR UNANIMIDAD**

# **"Mecanismos implicados en las conductas inducidas por el alcohol: el papel de los enzimas cerebrales responsables del metabolismo del acetaldehído".**

**Tesis doctoral presentada por M<sup>a</sup>. Dolores Escarabajal Arrieta  
Mayo, 2000**

Existe un constante aumento del consumo de bebidas alcohólicas unido a un porcentaje de personas alcohólicas cada vez mayor lo que demanda nuevos estudios que puedan aportar algo de claridad a la pregunta de por qué la gente bebe.

En este sentido se presenta el estudio realizado sobre los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del etanol tras las manipulaciones farmacológicas de la actividad de la catalasa y de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) cerebrales, manipulaciones que generan modificaciones en algunas de las conductas inducidas por el etanol.

Así, la manipulación tanto de la formación de acetaldehído (AcH), mediante el enzima catalasa, como de la degradación, mediante el enzima ALDH, más concretamente el isozima ALDH2, supone la implicación de este como metabolito activo del etanol.

En función de lo anterior, desde este trabajo se plantea que el AcH, producido a nivel central, mediaría algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

El desarrollo de este trabajo permitirá evaluar la mediación de la catalasa y la ALDH cerebrales en el metabolismo del etanol; para ello se han utilizado diferentes sustancias como el 3-amino-1,2,4-triazol (AT), el ácido dietildithiocarbamato (DDTC) y la cianamida.

La novedad y originalidad de este trabajo se basa en que en ningún trabajo anterior se ha planteado un estudio del metabolismo del etanol desde la inhibición de todos los pasos de su curva metabólica, es decir, desde la formación y la degradación del AcH producidas por la manipulación farmacológica de los sistemas enzimáticos implicados en el mismo y, por otra, debido a la utilización de determinadas sustancias como el DDTC o la conjunción de éste y el 4-MP, para la evaluación del efecto de esas manipulaciones sobre la conducta inducida por etanol.

Estas manipulaciones farmacológicas son relevantes y originales en la medida que aúnan en un mismo trabajo, por una parte, inhibidores específicos de la catalasa cerebral como el AT, por otra, al DDTC que inhibe la ALDH y, finalmente, la conjunción de la inhibición de ambos enzimas mediante la acción de la cianamida. Así, la demostración de la implicación de catalasa y ALDH en el metabolismo central del etanol supondría un nuevo punto de apoyo en la hipótesis que plantea la existencia de un metabolismo central del etanol en el que el AcH tendría un papel determinante como mediador de algunas de las acciones del etanol.

Las conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que las sustancias utilizadas como inhibidores de la catalasa o de la ALDH producen una reducción o bloqueo de la actividad locomotora inducida por etanol. Además, la administración conjunta de 4-MP y DDTC o cianamida genera, en el primer caso, una inducción de la actividad inducida por etanol y, en el segundo, se obtiene una anulación del efecto inhibitorio producido por la cianamida. Las diferencias encontradas en el patrón de conducta que se obtiene tras la administración de 4-MP junto los mencionados inhibidores -DDTC y cianamida- podría deberse a la acción inhibitoria diferencial que ejercen estas sustancias. Así, mientras que el DDTC inhibe solo la actividad del enzima ALDH la cianamida ejerce su efecto inhibitorio tanto sobre la actividad de la ALDH como sobre la actividad del enzima catalasa.

La inocuidad de estas sustancias podría indicar que dado que no afectan a la actividad locomotora espontánea la acción que se observa tras su administración se estaría produciendo sobre circuitos implicados en la mediación de las conductas inducidas por etanol. De este modo, todas estas sustancias podrían ejercer estos efectos a través de su acción en los sistemas enzimáticos catalasa y ALDH cerebrales.

Así, la implicación de los enzimas encargados tanto de la formación como de la degradación del AcH en las conductas inducidas por el etanol daría de forma indirecta, apoyo a la idea de una mediación del AcH en algunas de las acciones psicofarmacológicas inducidas por el etanol, en este caso, la actividad locomotora.

# **"The mechanisms involved in alcohol-induced behaviors: the role of brain enzymes responsible for the metabolism of acetaldehyde"**

**Ph.D. Dissertation by M. Dolores Escarabajal Arrieta.  
May 2000**

The ever increasing consumption of alcoholic drinks and the steadily escalating number of alcoholics demand constant research to cast light on why people drink.

This study is about the enzymatic systems involved in the metabolism of ethanol after pharmacological manipulation of the activities of brain catalase and aldehyde dehydrogenase (ALDH). Such an alteration causes changes in some of the behaviours induced by ethanol.

Both manipulation of acetaldehyde formation by catalase and acetaldehyde degradation by ALDH, in particular by the isozyme ALDH<sub>2</sub>, entail the idea that acetaldehyde is the active metabolite of ethanol. According to this, some of the psychopharmacological effects of ethanol could be mediated by brain acetadehyde. The role of brain catalase and ALDH in the metabolism of ethanol can therefore be evaluated here. To this end, several substances, like 3-amino-1,2,4-triazole (AT), diethyldithiocarbamic acid (DDTC) and cyanamide, have been analized.

No previous research has proposed the study of the metabolism of ethanol inhibiting all the steps of its metabolic curve, that is, from the acetaldehyde formation to the degradation caused by the pharmacological manipulation of the enzymatic systems involved in it. This study is new in that it takes intoconsideration the whole metabolic curve, but also in that it uses substances like DDTC, as well as in the concurrent administration of this substance with the 4-methylpyrazole (4-MP) to evaluate the effect of these manipulations on the behavior induced by ethanol.

These are new major pharmacological manipulations because they examine in one and the same study: first, inhibitors that act only on the brain catalase activity, like AT; second, the DDTC that inhibits the ALDH activity; finally, the joint inhibition of both enzymes by the action of the cyanamide. Evidence of catalase and ALDH enzymes operating in the central metabolism of ethanol could support the hypothesis of a central metabolism of ethanol in which acetaldehyde would play an important role in the mediation of some actions of ethanol.

This dissertation shows that the substances used as inhibitors of catalase or ALDH reduce or block the locomotor activity induced by ethanol. Moreover, the concurrent administration of 4-MP with DDTC or cyanamide causes, respectively, an increase in the activity induced by ethanol, and blocking of the inhibitory effect. The behavioral differences found after administration of 4-MP with DDTC or cyanamide could be due to the different inhibitory action of the latter two substances. Thus, while DDTC only inhibits ALDH activity, cyanamide inhibits both ALDH and catalase activity. Harmlessness of these substances could indicate that, if they do not affect the spontaneous locomotor activity, the effect following their administration could occur on the vias involved in the mediation of the behaviors induced by ethanol. All these substances could cause these effects by their action on brain enzymatic systems of brain catalase and ALDH.

The active role played by the enzymes that allow formation and degradation of acetaldehyde in the behaviors induced by ethanol would support the hypothesis that some psychopharmacological actions induced by ethanol, in particular the locomotor activity, could be mediated by acetaldehyde.

UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FACULTAD CIENCIAS HUMANAS Y SOCIALES  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA BÁSICA, CLÍNICA Y PSICOBIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONDUCTAS  
INDUCIDAS POR EL ALCOHOL: EL PAPEL DE LOS  
ENZIMAS CEREBRALES RESPONSABLES DEL  
METABOLISMO DEL ACETALDEHÍDO**

M<sup>a</sup> DOLORES ESCARABAJAL ARRIETA

JAÉN 2000



## **SUMARIO**

## SUMARIO

PRESENTACIÓN.

PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO.

SEGUNDA PARTE: DESARROLLO EXPERIMENTAL.

TERCERA PARTE: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

APÉNDICE: ESQUEMAS Y FIGURAS.

BIBLIOGRAFÍA.

SIGLAS Y ABREVIATURAS.

ÍNDICE GENERAL.

## **PRESENTACIÓN**

## PRESENTACIÓN

El trabajo que se presenta a continuación es el resultado de la labor experimental realizada como becaria de investigación (FPI) desde 1994 hasta 1998.

Estos experimentos se enmarcan dentro del proyecto de investigación “Mecanismos implicados en el consumo voluntario de alcohol: nueva hipótesis sobre el papel de la catalasa cerebral”, proyecto financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Plan I+D (SAF 93-0050) y dirigido por el Dr. Carlos M. González Aragón.

En el marco de este proyecto, la totalidad de los experimentos que componen la parte experimental de esta Tesis Doctoral, así como los estudios preliminares de la misma, se desarrollaron en el laboratorio de Psicobiología de la Universitat Jaume I de Castellón.

Por otra parte, como se recoge en el título de esta Tesis Doctoral, se presenta el estudio realizado sobre los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo del etanol. En este sentido, se exponen los resultados obtenidos tras las manipulaciones farmacológicas de la actividad de la catalasa y de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) cerebrales, manipulaciones que generan modificaciones en algunas de las conductas inducidas por el etanol.

Así, la manipulación tanto de la formación de acetaldehído (AcH), mediante el enzima catalasa, como de la degradación, mediante el enzima ALDH, más concretamente el isozima ALDH<sub>2</sub> con una afinidad baja por el AcH, supone la implicación de este como metabolito activo del etanol.

En función de lo anterior, desde este trabajo se plantea que el AcH, producido a nivel central, mediaría algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Así, los estudios realizados pueden encuadrarse dentro de la Farmacología de la Conducta, por lo que se ha seguido una metodología que aúna lo conductual y lo bioquímico. En el nivel conductual se ha seleccionado la actividad locomotora como variable dependiente; en cuanto al nivel bioquímico la variable evaluada ha sido la actividad enzimática cerebral.

En este sentido, el desarrollo de este trabajo permitirá evaluar la mediación de la catalasa y la ALDH cerebrales en el metabolismo del etanol; para ello se han utilizado diferentes sustancias como el 3-amino-1,2,4-triazol (AT), el ácido dietildithiocarbamato (DDTC) y la cianamida.

El planteamiento que sigue es novedoso y original ya que, por una parte, en ningún trabajo anterior se ha planteado un estudio del metabolismo del etanol desde la inhibición de todos los pasos de su curva metabólica, es decir, desde la formación y la degradación del AcH producidas por la manipulación farmacológica de los sistemas enzimáticos implicados en el mismo y, por otra, debido a la utilización de determinadas sustancias como el DDTC o la conjunción de este y el 4-MP, para la evaluación del efecto de esas manipulaciones sobre la conducta inducida por etanol.

Estas manipulaciones farmacológicas son relevantes y originales en la medida que aúnan en un mismo trabajo, por una parte, inhibidores específicos de la catalasa cerebral como el AT, por otra, al DDTC que inhibe la ALDH y, finalmente, la conjunción de la inhibición de ambas enzimas mediante la acción de la cianamida. Así, la demostración de la implicación de catalasa y ALDH en el metabolismo central del etanol supondría un nuevo punto de apoyo en la hipótesis que plantea la existencia de un metabolismo central del etanol en el que el AcH tendría un papel determinante como mediador de algunas de las acciones del etanol.

La Tesis Doctoral se presenta dividida en tres partes. En la primera se realiza una extensa revisión de la literatura existente acerca del etanol y los enzimas implicados en su metabolismo, así como de su primer metabolito, el AcH, para elaborar un balance y estado de la cuestión pertinente. Esta revisión abarca artículos, capítulos de libro y libros desde el año 1948 hasta comienzos de 1999. La exposición de la misma se ha realizado siguiendo un esquema general que presenta el metabolismo del etanol dividido en periférico y central, y dentro de este marco se han revisado los conocimientos y datos existentes sobre los enzimas implicados en este metabolismo periférica y centralmente.

En cuanto al AcH, y dado que el presente trabajo se inserta en el marco teórico del papel del AcH como responsable de los efectos psicofarmacológicos originados por el etanol, se presentan datos sobre la mediación de esta sustancia en algunas de las conductas inducidas por el etanol.

La segunda parte recoge el trabajo experimental realizado que ha sido dividido en cuatro partes motivadas por la búsqueda de una coherencia en cuanto a la realización y a la exposición de los experimentos.

En este sentido, los experimentos se presentan divididos en función de la sustancia que se esté utilizando como inhibidor. Por ello, hay una primera parte que recoge los experimentos realizados con el AT, la segunda expone los llevados a cabo con el 4-MP, la tercera los del DDTC y la cuarta presenta los experimentos realizados con la cianamida.

Cada una de estas partes o fases experimentales consta de una introducción teórica a la sustancia utilizada como inhibidor mientras que los objetivos, hipótesis, el protocolo experimental, los resultados y la discusión de los mismos están presentes en cada uno de los experimentos realizados (nº 1 al nº 14). Asimismo, cada una de las fases experimentales finalizan con una serie de conclusiones realizadas con la finalidad de presentar resumidamente los aspectos que se concluyen de los experimentos que integran cada fase experimental. Además, se contempla un apartado dedicado a los materiales y métodos comunes, a los objetivos generales y a las conclusiones globales de la Tesis.

En la tercera parte, se expone una síntesis de los resultados que son discutidos a la luz de la literatura existente. Esta tercera parte se completa con un apartado referido a las conclusiones que se pueden extraer a partir de los hallazgos realizados.

Tras esta tercera parte, se presenta un apéndice que recoge tanto algunas figuras explicativas complementarias como algunos esquemas, como por ejemplo, el referido al metabolismo del etanol (ver pág. 283) o los que muestran sobre qué enzima está actuando cada una de las sustancias utilizadas. En este último caso la inhibición de la actividad enzimática se ha representado mediante la presentación del enzima con el nombre tachado (ver pág. 284 y ss.).

Por último, se muestran las referencias bibliográficas consultadas, las siglas y abreviaturas utilizadas así como el índice general de este trabajo.

En relación con las referencias bibliográficas, cabría comentar que a lo largo del texto la cita de las mismas se ha realizado mediante el nombre del autor seguido por el año de

publicación. En los casos en los que los autores eran tres o más se ha optado por indicar solo el primero de ellos, y en los casos en los que los autores y el año eran coincidentes se han diferenciado mediante una letra minúscula al lado del año.

Por último, es preciso señalar que la falta de rigor y homogeneidad mantenida por los diferentes grupos de investigación en la designación de los isozimas de ALDH y de los metabolitos del disulfirán, ha supuesto la necesidad de realizar una sistematización de la nomenclatura de los mismos.

Finalmente, quisiera agradecer al Dr. Carlos M. González Aragón que aceptara dirigir esta Tesis Doctoral.

## I. INTRODUCCIÓN. METABOLISMO DEL ETANOL.

### 1.- Generalidades.

El etanol, etil alcohol o alcohol, es una droga de la que no se conoce bien su actuación central y que afecta a las principales funciones psicomotoras a través de una serie de complejos procesos fisicoquímicos y metabólicos.

El metabolismo del etanol genera una curva metabólica compuesta por varios pasos, así, en su oxidación el primer metabolito que encontramos es el AcH. La obtención de este compuesto está catalizada por diferentes enzimas, de forma que en la oxidación del etanol intervienen, en mayor o menor grado, la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y el enzima catalasa. En cuanto al metabolismo del AcH, el enzima implicado es la ALDH y mediante su acción se obtiene acetato, los últimos productos de este metabolismo son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el agua (H<sub>2</sub>O).

### 2.- Aspectos farmacocinéticos.

Los procesos que se dan en el organismo tras la ingesta de etanol pueden ser divididos en tres fases: la fase de absorción, la de difusión o distribución y la de eliminación (KALANT, 1971; GESSNER, 1993).

Durante la primera fase, el etanol es absorbido en las partes altas del tracto gastrointestinal por difusión ya que para esta sustancia no es necesaria la digestión precedente realizada por enzimas hidrolíticos. Sin embargo, no se puede excluir una oxidación parcial por parte de la ADH en la mucosa gastrointestinal (LAMBOEUF Y OTROS, 1981).

Los factores que pueden mediatizar este rango de absorción son, por ejemplo, la cantidad y la composición en cuanto a aditivos del alcohol, la concentración de las bebidas alcohólicas, así como la ingesta de comida.

Los experimentos realizados con el etanol C<sup>14</sup> muestran que la mayor parte del alcohol administrado oralmente es absorbido y que solo un pequeño porcentaje es excretado sin metabolizar por los pulmones, la orina y el sudor (CASIER Y POLET, 1959). En este sentido, una cantidad muy pequeña del etanol consumido es excretado o exhalado cuando las concentraciones en sangre del etanol están por debajo de 200 mg/100 ml o 40 mM (VON



WARTBURG Y BÜHLER, 1984). La siguiente fase, la fase de difusión, generalmente se superpone con esta primera fase de absorción.

Durante la fase de difusión el alcohol es distribuido en los tejidos en proporción sobre todo a su contenido en agua, agua intersticial e intracelular más sangre.

En la última fase, la fase de eliminación, el aspecto más destacado que se puede observar es un decremento en las concentraciones del alcohol en sangre, aproximadamente un 90% de la eliminación es realizada por la oxidación del etanol a dióxido de carbono y agua que representa el paso principal.

Por otra parte, la variación en la ruta de administración del etanol así como las diferencias entre especies desempeñan un importante papel en las diferencias observadas en la curva de alcohol en sangre. También, los factores hormonales, el peso corporal y el sexo influyen en el rango de degradación del etanol. En este sentido por ejemplo, teniendo en cuenta que el alcohol se distribuye en los tejidos en función de su cantidad de agua y que el promedio del volumen total de agua en el organismo es mayor en hombres que en mujeres, las correspondientes diferencias sexuales en las concentraciones de alcohol en sangre se dan incluso después de la ingestión de cantidades idénticas de alcohol. También se observan diferencias en función de la actividad del enzima ADH gástrico y el contenido en grasas. Así, las mujeres presentan una actividad menor de este enzima y un mayor contenido en grasas comparadas con los hombres (SÁNCHEZ-TURET, 1999). Además, el volumen total de agua en el organismo depende también de la edad (VON WARTBURG Y BÜHLER, 1984); en relación con este último factor se ha observado que las crías de ratas tuvieron una capacidad significativamente mayor para metabolizar etanol a AcH (SEMSEI Y OTROS, 1991; SHIVAKUMAR, 1991).

A continuación pasaré a comentar detalladamente cada uno de los aspectos implicados en el mencionado metabolismo. Cabría señalar que este metabolismo ha sido dividido, para su exposición, en periférico y central ya que aunque los enzimas implicados en ambos tipos de metabolismo son los mismos la proporcionalidad de su función es sustancialmente diferente si nos referimos a la oxidación de etanol en la periferia del organismo o a esa misma oxidación pero a nivel cerebral.

## **PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO**

## **II. METABOLISMO PERIFÉRICO DEL ETANOL.**

### **1.- Oxidación hepática del etanol.**

El etanol es eliminado del organismo casi exclusivamente por oxidación. Este proceso se da principalmente en el hígado, mediado por la ADH citosólica. Así, el alcohol es metabolizado enzimáticamente por la ADH primero a AcH (PETERSEN Y OTROS, 1983) y después, por la ALDH, a acetato (LIEBER, 1977; EHRIG Y OTROS, 1990).

Por otra parte, una pequeña porción de ese etanol, un 10% o menos, puede ser metabolizado por rutas alternativas, como por ejemplo la vía de oxidación microsomal o la vía de la catalasa (LIEBER, 1977; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997). El MEOS y la catalasa tienen valores para la constante de Michaelis (Km) mayores que la ADH por eso sólo llegan a ejercer una acción significativa a niveles elevados de etanol, cuando la ADH está inhibida o, en el caso del MEOS, cuando el consumo de etanol es crónico (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997). Por otra parte, también se ha propuesto en este metabolismo un mecanismo que implica a los radicales libres (WINSTON Y CEDERBAUM, 1983a, b).

En las páginas siguientes se comentarán los datos existentes sobre los enzimas implicados en el metabolismo hepático del etanol.

### **2.- Sistemas enzimáticos.**

#### **2.1.- La alcohol deshidrogenasa (ADH).**

##### **2.1.1.- Aspectos generales.**

Según Ehrig y otros (1990) uno de los principales enzimas del metabolismo del etanol es la alcohol deshidrogenasa hepática (ADH, alcohol: NAD-oxidorreductasa, EC 1.1.1.1).

La ADH cataliza la conversión reversible de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas con el nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD) como cofactor.



De este modo, oxida el etanol a acetaldehído por medio de la transferencia de hidrógenos desde el substrato al cofactor (NAD) dando lugar en la conversión a su forma reducida, el nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido (NADH). La conversión del coenzima quedaría expresada en la siguiente igualdad (KÖSSEL, 1982):



Como se dijo anteriormente, el etanol es metabolizado principalmente en el hígado por la ADH, aunque este enzima existe también en otros tejidos, como el riñón y los pulmones, entre otros (ERWIN Y DEITRICH, 1972).

La ADH hepática cataliza la oxidación de etanol a AcH y la reducción simultánea de NAD a NADH. El enzima está localizado en el citosol presentando una constante de afinidad (Km) relativamente baja (VON WARTBURG Y OTROS, 1983), y funciona a su capacidad máxima con cantidades relativamente pequeñas de alcohol en sangre. El paso que limita el rango en este proceso es el rango en el que el hígado regenera NAD desde el NADH. Para lograr esto, el piruvato es reducido a lactato por el NADH y el lactato pasa a la sangre (ERIKSSON, 1977).

Este enzima tiene un orden cinético cero y su velocidad de reacción no se incrementa por la presencia de etanol en cantidades grandes.

### **2.1.2.- Isozimas de la ADH: Composición y polimorfismo.**

Varios estudios han mostrado que la actividad de la ADH hepática humana tiene una gran variabilidad interindividual (LI Y MAGNES, 1975; SCHENKER Y OTROS, 1971). En este sentido, las diferencias en el metabolismo reflejan principalmente el amplio rango de propiedades catalíticas de la ADH hepática humana y la de otros animales debidas al amplio número de formas moleculares observadas en este enzima, se podría decir que la ADH en función de sus características electroforéticas y catalíticas es una mezcla de un amplio número de isozimas (SMITH Y OTROS, 1973; JÖRNVALL Y OTROS, 1987a).

Teniendo en cuenta que la ADH es un multigen, es decir, un sistema alélico múltiple (JÖRNVALL Y OTROS, 1991) que en seres humanos constituye una familia compleja, a partir de

sus rasgos estructurales y cinéticos, así como por la composición de sus isozimas puede ser dividida en cinco clases (YIN, 1994).

Los isozimas de la clase I están formados por una asociación aleatoria de los tres tipos de subunidades polipeptídicas, la subunidad alfa ( $\alpha$ ), la beta ( $\beta$ ) y la gamma ( $\gamma$ ) estando estas controladas en el gen estructural por tres *loci* separados, ADH<sub>1</sub>, ADH<sub>2</sub> y ADH<sub>3</sub> respectivamente (SMITH Y OTROS, 1973). Además, un isozima puede ser homodimérico o heterodimérico en función de si está formado por dos monómeros idénticos codificados por un alelo específico en uno de los *loci*, por ejemplo  $\beta\beta$  o  $\alpha\alpha$ , o si por el contrario su formación consta de polipéptidos diferentes, codificados por alelos en *loci* separados, dando lugar a heterodímeros adicionales, por ejemplo  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$  (HARADA Y OTROS, 1978a).

La clase ADH-I beta de baja Km, para el metabolismo del etanol, y la clase ADH-gamma muestran polimorfismo genético entre poblaciones raciales. La clase IV ADH-mu ( $\mu$ ) también muestra variabilidad genética y se ha detectado en la mucosa del estómago de caucásicos pero no en una amplia proporción (70%) de los orientales. Los isozimas de las clases I, II, IV y V tienen una distribución específica en los tejidos que integran (YIN, S. J., 1994).

En relación con esto, a partir de datos inmunológicos y de los referidos a la estructura protéica de estos isozimas se sugiere que las clases I, II y III tienen un origen evolutivo separado (ADINOLFI Y OTROS, 1984; BÜHLER Y OTROS, 1984).

Además de las formas comunes de ADH, existen otras formas moleculares menos conocidas. Así, los isozimas de la clase II de la ADH los forman la ADH pi ( $\Pi$ ) y los isozimas de la clase III los integran la ADH chi ( $\chi$ ). Estas dos clases (II y III) difieren en su especificidad por el sustrato y en sus propiedades cinéticas y ambas han sido detectadas y caracterizadas en hígados humanos (BOSRON Y OTROS, 1979; PARES Y VALLEE, 1981). Otra forma adicional de la ADH es la forma Indianápolis (ADH<sub>Indianápolis</sub>) que poseen una mayor movilidad catódica o anódica (LI Y OTROS, 1977; BOSRON Y OTROS, 1983; PARES Y VALLEE, 1981). Estos isozimas difieren en su pH óptimo, la especificidad por el sustrato y las características cinéticas. La variante ADH<sub>Indianápolis</sub> parece darse solo entre las poblaciones de negros americanos (AGARWAL Y OTROS, 1981a).

En relación con el etanol, algunos autores han obtenido que la actividad oxidativa de esta sustancia en hígado, pulmón y tracto intestinal correlaciona con su patrón de isozimas de ADH (YIN, 1994). Además, los valores de  $K_m$  para el etanol de los isozimas de ADH implicados en la degradación del etanol están en un rango desde 49  $\mu\text{M}$  a 36  $\mu\text{M}$  y los valores de las velocidades máximas ( $V_{max}$ ) van desde 0.6 a 10 U/mg (EHRIG Y OTROS, 1990).

### 2.1.3.- Variantes genéticas de la ADH.

La forma variante del enzima producida en el *locus* de  $ADH_2$  polimórfica se conoce como ADH atípica ( $ADH_{2-2}$ ) y fue descubierta por Von Wartburg y otros (1965). Esta variante atípica contiene una subunidad  $\beta_2$  en lugar de la  $\beta_1$  que es la que se observa habitualmente en la forma típica del enzima. Por su parte, la variante atípica muestra un pH óptimo menor y una actividad catalítica mucho mayor que el enzima normal. Los datos indican que esta variante atípica es probablemente el resultado de la sustitución de un residuo alanino por uno prolino en el lugar de unión del coenzima (BERGER Y OTROS, 1974). Por esto, la diferencia estructural existente entre ambas parece ser la responsable de la alteración catalítica así como de la alteración en sus propiedades funcionales.

Esta variante genética atípica de la ADH está presente en diferentes proporciones en la población, de tal forma que la podemos encontrar en aproximadamente el 85% de los orientales como japoneses (OGATA Y MIZOATA, 1973), chinos (TENG Y OTROS, 1979) o vietnamitas (GOEDDE Y OTROS, 1980) mientras que sólo está presente entre un 5 y un 10% de los ingleses, un 14% de los alemanes y un 20% de los suizos (SMITH Y OTROS, 1971; BOSRON Y OTROS, 1983; FUKUI Y WAKASUGI, 1972).

Datos como la frecuencia significativa de alelos de  $ADH_2$  y de  $ADH_3$  en sujetos orientales con alcoholismo o con cirrosis alcohólica comparados con sujetos sanos apoyan la idea de que la variación genética en ADH y en ALDH, de la que se hablará más tarde, puede influir en la conducta de ingesta de alcohol y en la susceptibilidad al alcoholismo y posiblemente inducen daño en los órganos modulando el rango del metabolismo del etanol y del AcH (YIN, 1994).

Sobre el efecto de estos isozimas existen datos contradictorios, algunos autores como Whitfield (1994) plantean que la variación genética de la  $ADH_2$  tiene un efecto significativo sobre los niveles de etanol en sangre tras la ingesta de una dosis estándar de etanol pero según

este autor esto ocurre a causa de un efecto sobre el nivel máximo más que sobre el rango del metabolismo y, el polimorfismo de la ADH<sub>3</sub> no tendría ningún efecto. Sin embargo, otros autores (COUZIGOU Y OTROS, 1994) sugieren que el alelo de la ADH<sub>2-2</sub> y el de la ADH<sub>3-1</sub> desempeñarían un papel similar.

La actividad de la ADH hepática de los individuos que contienen el isozima atípico está considerablemente elevada. En este sentido, se podría esperar que estos individuos eliminaran el alcohol más rápidamente que los homocigóticos normales y esta mayor actividad podría ser la responsable de las reacciones iniciales de intoxicación al alcohol en japoneses y otros orientales (STAMATOYANNOPOULOS Y OTROS, 1975). Sin embargo, durante el metabolismo del etanol, muy pocos portadores fenotípicos del enzima atípico presentan un rango de eliminación mayor que los normales (EDWARDS Y EVANS, 1967; VON WARTBURG Y SCHÜRCH, 1968; SCHULZ Y OTROS, 1976), la explicación a este hecho es que en esos sujetos la reoxidación del NADH, el rango de regeneración del NAD desde el NADH, es el principal paso que limita el rango de la oxidación del alcohol y no la actividad de la ADH.

La reacción de ADH es el paso que limita el rango del metabolismo del etanol pero el rango de esta reacción es inhibido por concentraciones elevadas de AcH y NADH (CRABB Y OTROS, 1983). La cantidad de ADH en el hígado y las propiedades cinéticas de las diferentes formas enzimáticas presentes en un individuo dado son otros factores, además de los que afectan a la absorción y la distribución, que regulan el rango metabólico del etanol en un sujeto.

Inicialmente cuando ingerimos alcohol la ratio hepática de NADH/NAD es normal, y quizá durante solo unos pocos minutos, la cantidad de ADH es el rango limitante. Si la actividad de este enzima es particularmente alta, la cantidad de AcH formado excederá la capacidad del hígado para oxidarlo. El resultado sería que más AcH escaparía a la sangre produciendo los síntomas de la sensibilidad al alcohol observados en los sujetos con el isozima atípico (STAMATOYANNOPOULOS Y OTROS, 1975). En este sentido, y ya que más del 80% de los japoneses y otros mongoles poseen una ADH atípica, el rápido metabolismo del etanol combinado con una ALDH mitocondrial inactiva podrían ser los principales responsables de las reacciones aversivas observadas normalmente después de la ingesta de pequeñas cantidades de alcohol. Desgraciadamente, todos los estudios se han realizado midiendo la concentración de AcH en la sangre entre 30 y 60 minutos después de la ingesta de alcohol, desapareciendo una gran cantidad de AcH en los primeros minutos (DEITRICH, 1976).

Por otra parte, la ADH se ha estudiado con inmunohistoquímica en varios tejidos humanos y los resultados indican que esta se encuentra específicamente en tejidos que se sabe están dañados por el abuso del alcohol (BÜHLER Y OTROS, 1983). Esto podría apoyar la idea de que las células especializadas dentro de un órgano pueden contener altas cantidades de ADH, incluso aunque la actividad total del enzima pueda parecer insignificante en ese tejido.

Los datos obtenidos sobre la actividad de la ADH en diferentes tejidos de rata indican que ésta disminuye en el siguiente orden (RASKIN Y SOKOLOFF, 1972):

- hígado
- intestino
- corazón
- bazo
- cerebro y
- músculo esquelético.

#### **2.1.4.- ADH como marcador biológico: Actividad de ADH en sangre.**

Un factor principal en la determinación de la amplia variabilidad observada en el rango de oxidación del alcohol entre los individuos parece ser la igualmente amplia variabilidad de la actividad de la ADH hepática humana. Esto es debido principalmente al polimorfismo genético de este enzima. De hecho, pueden darse alrededor de veinte formas de enzimas en un individuo y un amplio rango de  $K_m$  para los sustratos y de  $V_{máx}$  son observadas para varios isoenzimas (PIETRUSZKO, 1975; VON WARTBURG Y OTROS, 1983). Por lo tanto, las farmacocinéticas de la eliminación del alcohol y de la producción del AcH puede variar en una forma predeterminada genéticamente de un sujeto a otro. Una vez más, las propiedades catalíticas de estas formas enzimáticas varían considerablemente y es probable que existan diferencias en el rango de oxidación del aldehído en función de la variedad de fenotipos.

Aunque la actividad más elevada de la ADH se da en el hígado, la aparición de este enzima en el plasma podría tener un importante papel para establecer un diagnóstico o para hacer un pronóstico en sujetos que presenten alteraciones relacionadas con el alcohol ya que puede reflejar daño hepático después de abusar del alcohol. Sin embargo, los estudios que se han realizado utilizando los niveles de ADH en suero como único marcador de alcoholismo no han obtenido resultados alentadores ya que, aunque establecía diferencias entre sujetos



sanos y pacientes alcohólicos, la comparación de estos últimos con pacientes psiquiátricos no alcohólicos indicó los mismos niveles para la ADH en sangre. Por lo tanto, es necesaria más investigación para determinar si el incremento en plasma de la actividad de la ADH en sujetos alcohólicos es el resultado del daño hepático y si esta podría compensar el metabolismo oxidativo del alcohol en sujetos con daño hepático utilizándolo en combinación con otros marcadores bioquímicos (GOEDDE Y OTROS, 1983a). Otros autores (LI Y OTROS, 1977), en la búsqueda de una significación fisiológica de los isozimas de ADH, han planteado la posibilidad de que la insensibilidad de la ADH- $\pi$  al pirazol con una alta Km para el etanol sea un posible determinante del alcoholismo.

Por otra parte, aunque la complejidad del fenotipo alcohólico hace que la identificación de los efectos genéticos del alcoholismo sea difícil (CRUZ-COKE, 1973), algunos estudios han planteado que la ADH puede ser el centro del problema ya que el alcohol es metabolizado por ADH, y este enzima está controlado por un polimorfismo genético (CRUZ-COKE, 1979; 1983), así, por ejemplo, una variante genética, la ADH<sub>2</sub>, aislada del hígado humano puede dar cuenta del 40% de la oxidación total del etanol del hígado (LI Y OTROS, 1977). Por su parte, Schuckit y Rayses (1979) encontraron diferencias en las concentraciones de AcH en la sangre de familiares de alcohólicos y en controles de familias no alcohólicas.

Así, el conjunto de datos presentados anteriormente parecen indicar una importante función para el enzima ADH en el metabolismo periférico del etanol.

A continuación se presenta la aportación en este metabolismo periférico del etanol de otros sistemas enzimáticos alternativos a la ADH, como son el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y la catalasa.

## **2.2.- Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS).**

### **2.2.1.- Aspectos generales.**

En general, es aceptado que en el metabolismo hepático del etanol, además del importante papel atribuido a la ADH, dos vías diferentes realizan también una oxidación del etanol de un 10% o menos. Estas rutas serían, por una parte, el MEOS donde el citocromo P-450 es el enzima más determinante y, por otra, la vía formada por el complejo catalasa-

peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (TESCHKE Y OTROS, 1976; LIEBER, 1977). Sin embargo, aunque estos dos sistemas han sido estudiados con detalle su contribución al metabolismo global del etanol no está claramente delimitada (THURMAN Y HANDLER, 1989). Por otra parte, en lo que se refiere a esta oxidación periférica del etanol, tanto el MEOS como el enzima catalasa poseen valores para la constante de afinidad mayores que los obtenidos para la ADH hepática de forma que su intervención llega a ser significativa solo cuando la ADH es inhibida, cuando los niveles de etanol en el organismo son muy altos y en el consumo crónico de etanol.

En este sentido, se indicó que los microsomas hepáticos podrían catalizar la oxidación del etanol. Por su parte, Lieber y DeCarli (1970) plantearon la descripción de un sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), este sistema no constaría solamente de la oxidación dependiente del P-450 (KOOP Y OTROS, 1982), sino que integraría también la peroxidación del etanol vía el enzima catalasa obtenido a partir del  $H_2O_2$  generado vía el NADHP oxidado.

## **2.2.2.- Citocromo P-450.**

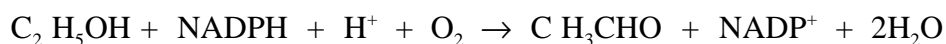
### **2.2.2.1.- Generalidades.**

El citocromo P-450 (CYP-450) dependiente del sistema microsomal de monooxigenasa constituye un término genérico que incluye a una familia multigénica de citocromos hemoproteínicos localizados en los cuerpos de las células nerviosas y colocalizados con la reductasa CYP-450 NADPH, el componente necesario para el sistema P-450 monooxigenasa (RAVINDRANATH Y OTROS, 1990). Estos citocromos son inmunológica y bioquímicamente diferentes, aunque todos aceptan un electrón de la NADPH citocromo c reductasa.

El P-450 es un enzima complejo implicado en la detoxificación de drogas y toxinas en el hígado, también se encarga de la activación de compuestos endógenos y exógenos y puede darse en múltiples formas. En este sentido, se han producido anticuerpos específicos contra las diferentes formas del citocromo P-450, lo cual demuestra las diferencias estructurales específicas entre las diferentes especies de este citocromo. De hecho, se han identificado por lo menos 16 especies diferentes del citocromo (ROTH, 1993).

Respecto al metabolismo del etanol, el citocromo P-450 que se relaciona más directamente con este es el citocromo P-450 2E1 ya que presenta una afinidad alta por el etanol. Esta forma del citocromo ha sido identificada en diferentes animales como conejos (KOOP Y OTROS, 1982), ratas (RYAN Y OTROS, 1986) y *deermice* (HANDLER Y OTROS, 1988).

La ecuación siguiente da cuenta de la oxidación del etanol por parte de este isoenzima:



El pH óptimo para esta reacción se encuentra dentro del rango fisiológico; la  $K_m$  para el etanol es de 16 mM (ASAI Y OTROS, 1996) la cual obviamente es mucho mayor que la ADH hepática que está alrededor de 1 mM.

Los datos existentes respecto al papel del citocromo P-450 en la oxidación del etanol son contradictorios, en este sentido existen datos sobre que un 50% del metabolismo del etanol en animales normales se produce mediante el citocromo P-450 (TAKAGI Y OTROS, 1986) mientras que otros datos le adjudican una contribución del 25-35% de la eliminación que se produce (HOLDFORD, 1987; HANDLER Y OTROS, 1988).

#### **2.2.2.2.- Inducción del citocromo P-450 2E1.**

Por otra parte, aunque las concentraciones basales indican que el 2E1 representa menos del 1% de la actividad total de los citocromos existentes (WARNER Y GUSTAFSSON, 1994) la actividad del MEOS puede ser inducida por varias drogas entre ellas, por la ingesta crónica de etanol. En este sentido, se ha constatado que el citocromo P-450 2E1 es inducible por etanol, y se ha informado de incrementos de tres a cinco veces en su actividad después de la administración de etanol (MORGAN Y OTROS, 1982; ANANDATHEERTHAVARADA Y OTROS, 1993; MONTOLIU Y OTROS, 1994; SOHDA Y OTROS, 1993).

Por otra parte, estudios realizados con la cepa de ratones *deermice* (*Peromyscus maniculatus*) que aunque carecen de ADH, (BURNETT Y FELDER, 1978a, b), los ADH<sup>-</sup>, eliminan etanol en una proporción tan rápida como los ratones de la misma cepa pero con una ADH normal, los ADH<sup>+</sup>, (HANDLER Y OTROS, 1988; SHIGETA Y OTROS, 1984; GLASSMAN Y OTROS, 1985)

indicaron que el tratamiento con etanol, utilizando anticuerpos del P-450 de conejo, induce en las cepas ADH<sup>+</sup> y ADH<sup>-</sup>, un análogo inmunoquímico del P-450 2E1 (HANDLER Y OTROS, 1988). También se ha obtenido que el etanol induce este citocromo en mayor cantidad en la cepa ADH<sup>-</sup> que en la ADH<sup>+</sup>.

Shigeta y otros (1984) informaron de que el tratamiento con etanol en ratones ADH<sup>+</sup> y ADH<sup>-</sup> implica un incremento en el rango de oxidación del etanol por los microsomas hepáticos e incrementa paralelamente un aumento en el contenido del P-450 microsomal. Sin embargo, aunque los datos *in vitro* proporcionan una evidencia importante de la inducción del P-450 2E1 y establece su papel como catalítico predominante de la oxidación del etanol en los microsomas de estos ratones, los estudios *in vivo* no indican un papel directo de este enzima en la eliminación del etanol *in vivo*.

Por otra parte, se ha planteado que los rangos del metabolismo *in vitro* del etanol pueden ser comparados a los rangos de eliminación del etanol *in vivo*. En esta comparación, se estimó que el P-450 2E1 da cuenta solo del 3% de la eliminación en los animales ADH<sup>+</sup> y alrededor de un 8% en los ADH<sup>-</sup>. Incluso tras el tratamiento con etanol, el citocromo P-450 2E1 da cuenta de solo el 22% de la eliminación del etanol *in vivo* (HANDLER Y OTROS, 1988). Así, el citocromo P-450 2E1 tiene un papel menor en la eliminación del etanol *in vivo*.

En un estudio realizado sobre el papel de las vías de oxidación del etanol no dependientes de ADH, como son el citocromo P-450 y la catalasa con la cepa de ratones *deermice* ADH<sup>-</sup>, se ha observado que 6 horas después del pretratamiento *in vitro* con AT, un inhibidor no competitivo del enzima catalasa, los niveles de catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígados perfundidos fueron disminuidos por el etanol y la actividad peroxidática de la catalasa volvió a sus niveles basales (THURMAN Y HANDLER, 1989). Por tanto, se podría concluir que en los ratones ADH<sup>-</sup> se oxida etanol vía la catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras 6 horas de tratamiento con AT.

Por el contrario, la oxidación del etanol por el P-450 no se detectó después de 6 horas de tratamiento con AT. Esta diferencia en la recuperación de la actividad es debida probablemente al rango de síntesis de esas dos hemoproteínas. Así, mientras que la actividad total de la catalasa hepática puede ser resintetizada en 12 horas (NAKAMURA Y OTROS, 1973), la recuperación del citocromo es mucho más lenta (OMURA, 1973).

Además, teniendo en cuenta que ya que la eliminación del etanol y la actividad peroxidática de la catalasa retornaron a los niveles basales mientras que la oxidación del etanol dependiente del citocromo P-450 seguía inhibida por el AT se podría afirmar que la oxidación del etanol es catalizada sobre todo por el sistema catalasa- $H_2O_2$  en estos mutantes mientras que el citocromo P-450 2E1 desempeñaría un papel menor en el metabolismo del alcohol.

En el estudio comentado anteriormente también se utilizó el butanol como herramienta para evaluar la vía de eliminación del etanol en los ADH<sup>-</sup>, ya que en ratas el butanol es oxidado en los microsomas por el P-450 pero no por la catalasa. Además, el butanol es un sustrato selectivo para el P-450 en ratones con ADH<sup>-</sup> y se utiliza como una herramienta para determinar y diferenciar las dos vías, la de la catalasa y la del P-450. Los datos obtenidos indican que en esta cepa el P-450 tiene una afinidad similar por el etanol y por el butanol. A partir de esto se podría concluir que el rango de metabolismo del etanol vía citocromo es insuficiente para dar cuenta de la captación de etanol en hígados perfundidos de ratones con ADH<sup>-</sup>negativa. Además, se obtiene que el butanol se metaboliza en un rango de 4-9  $\mu\text{mol/g/h}$  mientras que el rango para el etanol es de 62-80  $\mu\text{mol/g/h}$  y, al ser la catalasa y el citocromo las únicas vías de oxidación en hígados perfundidos de ADH<sup>-</sup>, se podría afirmar que la oxidación del etanol es catalizada principalmente por la vía catalasa- $H_2O_2$  en este mutante.

A continuación se presentan los datos referidos al enzima catalasa y su contribución al metabolismo periférico del etanol.

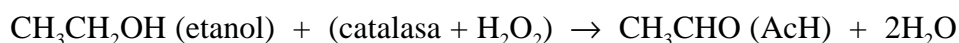
### **2.3.- Catalasa hepática.**

#### **2.3.1.- Aspectos generales.**

La catalasa (peróxido de hidrógeno: oxidoreductasa del peróxido de hidrógeno, EC 1.11.1.6) es un enzima localizado en los peroxisomas (GAUNT Y DE DUVE, 1976). La catalasa junto con la glutatona peroxidasa, funciona como un regulador de los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el organismo, un metabolito formado durante la detoxificación de los radicales de oxígeno reactivos, de esta forma, elimina la intoxicación provocada por el peróxido de hidrógeno, que se forma por la actividad de los enzimas respiratorios al escindirlos en agua y oxígeno. Cabe señalar también que este enzima contiene un grupo hemo como grupo prostético.

En un principio se creía que la catalasa era responsable únicamente de la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, Keilin y Hartree (1945) demostraron que la catalasa podía mediar la peroxidación del etanol a AcH en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Otros autores han demostrado lo mismo con catalasa purificada hepática de rata *in vitro* (KEILIN Y HARTREE, 1945; RASKIN Y SOKOLOFF, 1972). Posteriormente, se demostró espectrofotométricamente que la catalasa y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  forman un compuesto primario, al que se ha dado en llamar compuesto 1, que reacciona con el etanol para formar AcH y  $\text{H}_2\text{O}$ . Así, la oxidación del etanol por parte de la catalasa se realiza mediante el compuesto 1, formado por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la catalasa a través de una reacción peroxidática en la que se forma AcH y agua desde el compuesto 1 y el etanol que actúa como dador de hidrógenos.

De este modo, la catalasa oxidaría etanol a AcH de acuerdo con la siguiente reacción:



Los trabajos de Goodman y Tephly (1968), plantaron que la variable que actuaría como rango limitante sería el suministro de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la peroxidación del alcohol por la catalasa. Esta hipótesis fue confirmada después por Oshino y otros (1973), que también demostraron que la peroxidación del etanol está determinada por una parte, por la concentración de etanol y, por otra, por el rango de peróxido.

### 2.3.2.- Generación de $\text{H}_2\text{O}_2$ en hígado.

Para evaluar la hipótesis de que la catalasa podría tener un papel significativo en el metabolismo del alcohol se midieron los porcentajes de oxidación de butanol, un sustrato selectivo para la ADH, y los de metanol, un sustrato selectivo para la vía catalasa- $\text{H}_2\text{O}_2$  en hígados perfundidos de ratas alimentadas. Los resultados indicaron que el porcentaje de la oxidación de butanol fue unas diez veces mayor que los porcentajes para la oxidación del metanol, indicando que la ADH fue la vía predominante en el metabolismo del alcohol. Mientras que en hígados de ratas en ayuno, en presencia de oleato, la catalasa fue la vía predominante en el metabolismo del alcohol (HANDLER Y THURMAN, 1988).

Así, los estudios realizados sobre el rango de oxidación del butanol y del metanol indican que la peroxidación vía catalasa mediada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se forma por la oxidación

beta peroxisomal de los ácidos grasos es el paso principal en la oxidación del alcohol en animales con ayuno.

Los estudios realizados con AT en los ADH (THURMAN Y HANDLER, 1989) así como los realizados con ácidos grasos en hígados de ratas perfundidos demuestran claramente que la catalasa desempeña un significativo papel en el metabolismo del alcohol. Estos trabajos han puesto de manifiesto un papel mínimo para el P-450 2E1 en el metabolismo del etanol y la no implicación de los radicales hidroxilos en esa oxidación (HANDLER Y OTROS, 1988). Así, la conclusión de Shigeta y otros (1984) y de Takagi y otros (1986) de que la oxidación del etanol la cataliza principalmente el citocromo P-450 es inconsistente con estos datos. Esto indica que los resultados obtenidos en los estudios en los que se ha utilizado el AT para inhibir catalasa en la evaluación de la ruta metabólica del etanol deben ser tomados con cautela.

La noción de la catalasa como un paso menor en la oxidación del etanol ha sido revisada y aunque en un principio los datos eran contrarios a su implicación en la eliminación del etanol (BARLETT, 1952; NELSON Y OTROS, 1956) ya que no se controló la extensión de la inhibición de la actividad peroxidativa de la catalasa por el AT, estudios posteriores, utilizando este mismo inhibidor, muestran que la catalasa tiene un papel predominante en la oxidación del etanol (THURMAN Y HANDLER, 1989).

En el estudio realizado por Thurman y Handler (1989) el AT bloqueó el decremento en catalasa- $H_2O_2$  por el etanol medido espectrofotométricamente en hígados perfundidos. Así, después de 1.5 horas de pretratamiento con AT, la actividad peroxidática de la catalasa estaba inhibida. Además, esta actividad no pudo ser detectada *in vitro*. Al mismo tiempo, el rango de eliminación de etanol por la ADH disminuyó alrededor de un 75% y la actividad dependiente del citocromo P-450 también fue inhibida entre un 80-90% después de 1.5 horas del pretratamiento con AT.

Sin embargo, a partir de estos datos no se puede afirmar si en esta cepa de ratones la vía predominante para la oxidación del etanol es la mediada por la catalasa o es la del citocromo P-450.

Sin embargo, como se ha visto, los ADN<sup>-</sup> oxidan etanol via catalasa- $H_2O_2$  seis horas después del pretratamiento con AT. En ratas, la actividad de la catalasa se recupera alrededor

del 50% tres horas después de la inyección de AT (NAKAMURA Y OTROS, 1973). En contraste con esto, la oxidación por parte del citocromo no se detectó seis horas después del tratamiento con AT, estos datos se explican en función del rango de síntesis de estas dos hemoproteínas (NAKAMURA Y OTROS, 1973, OMURA, 1973). En función de lo anterior se podría reiterar que la oxidación del etanol en los ADH y bajo estas condiciones está mediada o catalizada predominantemente vía catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como conclusión a este apartado se podría afirmar que la ADH hepática conforma un sistema altamente eficaz en el metabolismo del etanol (PETERSEN Y OTROS, 1983) de forma que la función del MEOS y de la catalasa hepática en la oxidación del etanol es mínima. En cuanto a la comparación entre MEOS y catalasa, los datos apuntan a que la catalasa tiene una función mayor respecto a la desempeñada por el MEOS.

Como se expuso anteriormente, el etanol, después de su ingestión, se absorbe rápidamente desde el tracto intestinal y es distribuido uniformemente en el agua del organismo. La vía para disponer del etanol es su oxidación en el hígado a AcH mediante la acción de la ADH. Posteriormente, el AcH es oxidado por la ALDH dependiente de NAD (ALDH, EC 1.2.1.3) a ácido acético. La ALDH es el segundo mayor enzima del metabolismo del alcohol a nivel periférico y es responsable no solo de la oxidación del AcH sino también de la de otros aldehídos en el hígado humano y otros tejidos de mamíferos (WEINER, 1979).

## **2.4.- Aldehído deshidrogenasa (ALDH).**

### **2.4.1.- Aspectos generales.**

Debido a sus efectos agudos y crónicos en humanos, el AcH ha recibido una atención considerable. La ALDH cataliza la oxidación de AcH en el hígado y en otros órganos ya que al contrario que la ADH, que está localizada principalmente en el hígado, la ALDH se localiza prácticamente en cualquier órgano del cuerpo.

En el cuadro siguiente se recogen algunos datos de la distribución y de la actividad que presenta el enzima ALDH en diferentes tejidos (ver cuadro 1).

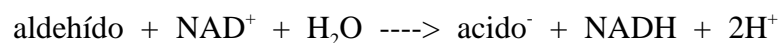


Cuadro 1. Distribución en tejidos de rata de la actividad de la ALDH medida por la oxidación del indol-acetaldehído (DEITRICH, 1966)

Tejido	Actividad (nmol/min por mg proteína)
Hígado	49.6
Riñón	9.0
Útero	4.4
Adrenal	2.9
Gónadas	2.0
Intestino delgado	1.6
Cerebro	1.0
Corazón	0.8
Adiposo	0.6
Pulmón	0.6

También, a diferencia de la ADH, que se encuentra exclusivamente en el citosol, la ALDH se encuentra en los microsomas y en la mitocondria así como en el citosol (DEITRICH Y OTROS, 1976). Las formas multimoleculares del enzima, poseen diferentes propiedades físicas y catalíticas, que se pueden encontrar en la mayoría de los orgánulos subcelulares.

La reacción catalizada por la ALDH es esencialmente irreversible en la dirección de la formación de acetato y la elevada eficiencia catalítica de la ALDH II y el alto rango de reoxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> por la mitocondria permite el metabolismo del etanol en un rango razonable en el hígado.



De hecho, parece que la oxidación del AcH en el hígado tiene lugar en el espacio matricial de la mitocondria y parece que una cisteína es el lugar activo ya que el enzima es

inactivado por compuestos como el p-cloromercuribenzoato, el disulfirán y otros reactivos conocidos que presentan un radical sulfidriilo.

## **2.4.2.- Isozimas.**

### **2.4.2.1.- Composición y polimorfismo isoenzimático.**

Aunque algunos estudios no han encontrado variaciones en los isozimas de ALDH (STAMATOYANNOPOULOS Y OTROS, 1975) posteriormente, en otros, utilizando métodos de electroforesis modificados se han observado al menos cuatro de los isozimas de la ALDH (GOEDDE Y OTROS, 1979b; TENG, 1981). Así, en este enzima, también se observa la existencia de un polimorfismo (EHRIG Y OTROS, 1990).

En la actualidad ya han sido identificados, en seres humanos, doce genes de ALDH. Estos genes, localizados en diferentes cromosomas, codifican un grupo de enzimas que oxidan varios aldehídos aromáticos y alifáticos (YOSHIDA Y OTROS, 1998).

En este sentido, el *locus* del gen para la ALDH en humanos se asigna al cromosoma 12 (BRAUN Y OTROS, 1986; HSU Y OTROS, 1986). Así, algunos estudios mediante la electroforesis de isozimas de ALDH mostraron que la ALDH hepática humana tiene al menos cuatro isozimas principales con diferente movilidad electroforética (HARADA Y OTROS, 1978b). También utilizando otra técnica isoeléctrica se ha demostrado la existencia de cuatro isozimas de ALDH diferentes en riñón, hígado, pulmón, músculo, corazón, estómago, cerebro y bazo (GOEDDE Y OTROS, 1979a).

Los enzimas que oxidan AcH y otros aldehídos están localizados en las regiones mitocondriales, citosólicas y del retículo endoplasmático de la célula (DEITRICH, 1966). Aunque hay múltiples formas moleculares de ALDH en el hígado humano, solo los isozimas de la clase I y II (E1 y E2) que son codificados por los lugares ALDH<sub>1</sub> y ALDH<sub>2</sub> respectivamente, son los implicados en la oxidación del AcH. De hecho, son los dos isozimas más relevantes de la ALDH hepática (ALDH I o E1 ALDH II o E2).

Estos isoenzimas difieren en sus propiedades funcionales y en su estructura. De entre las propiedades cinéticas de los isozimas ALDH<sub>1</sub> y ALDH<sub>2</sub> aislados de hígado humano cabe destacar las siguientes, la ALDH<sub>1</sub> y la ALDH<sub>2</sub> humanas son moléculas tetráméricas, con

subunidades de alrededor de 500 aminoácidos (JÖRNVALL Y OTROS, 1987b). Además, ambas son dependientes de  $\text{NAD}^+$ . Por otra parte, la  $\text{ALDH}_2$  presenta una baja  $K_m$  para el AcH (2-3  $\mu\text{M}$ ) y un valor de  $K_m$  alto para el NAD (70  $\mu\text{M}$ ) y es predominantemente de origen mitocondrial mientras que la  $\text{ALDH}_1$  tiene una  $K_m$  relativamente mayor (30  $\mu\text{M}$ ) para el AcH y una  $K_m$  baja para el NAD (8 $\mu\text{M}$ ) y se encuentra en abundancia en la fracción citosólica subcelular.

En condiciones normales es el enzima de la matriz mitocondrial, la  $\text{ALDH}_2$ , el que es efectivo en la oxidación del AcH porque está presente en relativamente grandes cantidades y tiene una  $K_m$  muy pequeña para este aldehído (GRUNNET Y OTROS, 1973; TOTTMAR Y OTROS, 1973; RIKANS, 1990). Como se ha comentado, hay otras formas diferentes de ALDH en el citosol pero la ALDH citoplasmática no se adapta bien a la oxidación de pequeñas cantidades de AcH y el tener una alta  $K_m$  para esta sustancia y estar presente en pequeñas cantidades (DEITRICH Y OTROS, 1972; RIKANS, 1990) hace que sean menos importantes que la  $\text{ALDH}_2$  en el metabolismo del AcH. El AcH que escapa a la oxidación queda libre para difundir dentro de la sangre o causa sus efectos tóxicos mientras aún está en el hígado (KORSTEN Y OTROS, 1975).

Como se ha comentado, los isozimas de ALDH de hígado humano son tetrámeros que constan de subunidades desiguales con un peso molecular de 54.800 y 54.200 daltons, respectivamente (GREENFIELD Y PIETRUSZKO, 1977; HARADA Y OTROS, 1980a). Las múltiples formas moleculares de la ALDH muestran una heterogeneidad considerable en cuanto a su distribución de tejidos y órganos. Así, de acuerdo con Greenfield y Pietruszko (1977) la mayoría de isozimas de ALDH se encuentran principalmente en el hígado y en el riñón mientras que en otros tejidos la presencia de los mismos es variable. Por su parte, los eritrocitos sólo contienen  $\text{ALDH}_2$  (AGARWAL Y OTROS, 1982a).

El isozima  $\text{ALDH}_3$  fue detectado en estómago y pulmones y como una débil banda en bazo, hígado y riñón. La banda del isozima  $\text{ALDH}_4$  fue detectada en hígado, riñón y una banda de actividad débil en corazón, intestinos y extractos de piel. Los extractos de los folículos de raíces de pelo humano mediante el tratamiento isoeléctrico mostraron una  $\text{ALDH}_1$  destacada y una débil banda del isozima  $\text{ALDH}_2$  (GOEDDE Y OTROS, 1980).

Los isozimas  $\text{ALDH}_1$  y  $\text{ALDH}_2$  aislados del cuero cabelludo mostraron propiedades cinéticas similares a las correspondientes del hígado. Algunos de los análisis realizados con

extractos de raíces de pelo y anticuerpos contra la ALDH<sub>1</sub> hepática mostraron una identidad inmunológica entre la ALDH<sub>1</sub> de las dos fuentes comentadas (GOEDDE Y OTROS, 1985).

#### **2.4.2.2.- Bases moleculares y bioquímicas de la anormalidad en la ALDH<sub>2</sub>.**

En cuanto a alteraciones en los genes de ALDH, se han observado desórdenes metabólicos y problemas clínicos asociados con las mutaciones de los genes para la ALDH<sub>1</sub>, la ALDH<sub>2</sub>, la ALDH<sub>4</sub> y la ALDH<sub>10</sub> (YOSHIDA Y OTROS, 1998).

En relación con el metabolismo del etanol, la expresión de la forma inactiva de la ALDH<sub>2</sub>, también denominada variante oriental, genera un déficit en la capacidad para metabolizar AcH (EHRIG Y OTROS, 1990). La causa subyacente para la deficiencia del isozima podría ser una supresión en un gen que codifique para el enzima (TENG, 1981), una mutación estructural que lleve a la síntesis de una proteína enzimáticamente no funcional (YOSHIDA Y OTROS, 1984; YOSHIDA Y DAVE, 1985; IMPRAIN Y OTROS, 1982; JONES, 1982) o una proteína menos funcional (AGARWAL Y OTROS, 1984; FERENCZ-BIRO Y PIETRUSZKO, 1984a).

Algunos estudios ponen de manifiesto que la ALDH con una deficiencia de isozima ALDH<sub>2</sub> tuvo una actividad menor para el AcH presentando al mismo tiempo una Km para el AcH mayor que la ALDH usual. En este sentido, mientras que la actividad de la ALDH normal fue inhibida entre un 20-30% con disulfirán, la actividad de la ALDH anormal fue inhibida por encima de un 90% (HARADA Y OTROS, 1980b).

Así, los valores obtenidos en relación con la inhibición de los isozimas ALDH<sub>1</sub> y ALDH<sub>2</sub> de la ALDH de hígado humano por el disulfirán son del 44% y 68% de su actividad respectivamente.

En este sentido, las diferencias observadas en la actividad metabolizadora para el etanol y el AcH de las formas de los alelos para los enzimas puede ser parte responsable de las amplias variaciones observadas en el rango del metabolismo del etanol en humanos. Por lo tanto, las diferencias interindividuales en los patrones isoenzimáticos pueden contribuir a la

predisposición genéticamente determinada para la ingesta excesiva de alcohol (EHRIG Y OTROS, 1990).

### **2.4.3.- Aspectos genéticos.**

#### **2.4.3.1.- Generalidades.**

Aunque hay otros factores, como los culturales y los étnicos, considerados los principales responsables de los diferentes patrones de ingesta de bebidas en una sociedad, existe, sin embargo, un elevado número de estudios que indican claramente la implicación de los factores genéticos en la evolución de los hábitos de bebida en humanos. Así, los estudios genéticos revelan que no todo el mundo tiene el mismo riesgo de desarrollar desórdenes relacionados con el alcohol. La importancia de los factores genéticos está siendo puesta de manifiesto por los estudios de poblaciones y de familias tanto de gemelos como de adopciones (PROPPING, 1977; HEATH, 1995; SORBEL Y OTROS, 1996). Así, algunos autores (THOMASSON Y OTROS, 1991; AGARWAL Y GOEDDE, 1992; HIGUCHI, 1994) defienden que las diferencias farmacogenéticas entre los diferentes sujetos en su capacidad de metabolizar el alcohol ingerido son, posiblemente, las responsable de las grandes diferencias interindividuales e interétnicas observadas en el resultado del uso y abuso del alcohol. Por otra parte, los estudios de gemelos y de adopciones han puesto de manifiesto que la heredabilidad del alcoholismo es mayor del 50% (GOLDMAN Y ENOCH, 1990).

En este sentido, los enzimas implicados en el metabolismo del alcohol y del AcH exhiben una gran heterogeneidad determinada genéticamente con polimorfismos de enzimas e isozimas, lo cual lleva a una amplia variedad de fenotipos individuales en enzimas diferentes. Se perfila así la hipótesis de que las diferencias individuales y raciales en el metabolismo del alcohol está determinada genéticamente por la variabilidad de los enzimas participantes, la ADH y la ALDH (VON WARTBURG Y BÜHLER, 1984; THOMASSON Y OTROS, 1991; HIGUCHI, 1994).

Como se ha visto anteriormente, en los orientales que carecen de la ALDH mitocondrial de baja Km, se produce una acumulación de AcH que genera síntomas de intoxicación, lo que se ha dado en llamar *flushing*. Este síndrome de aldehído agudo es muy aversivo ya que es similar a la inhibición de la ALDH por disulfirán, que es una droga ampliamente utilizada en la terapia clínica para el alcoholismo (MOTTIN, 1973) y parece por ello prevenir a estos sujetos de beber alcohol.

Por otra parte, desde los resultados obtenidos en estudios realizados con diferentes subgrupos de sujetos se ha llegado a la afirmación de la existencia de una influencia genética en la ingesta de alcohol. Así, en los alcohólicos se observan ligeros aumentos de AcH en sangre. Sin embargo, hay indicaciones de que el aldehydismo crónico no es solo consecuencia de una ingesta excesiva de alcohol sino que puede reflejar también un patrón enzimático preexistente que está determinado genéticamente.

También se ha observado que hay un fuerte contraste entre la susceptibilidad relativamente alta de bebedores ocasionales y la destacable resistencia de algunos bebedores consumados. Esas diferencias en susceptibilidad podrían estar también determinadas por factores genéticos.

#### **2.4.3.2.- Formas de ALDH con alta y baja Km.**

Aunque los enzimas hepáticos equinos y humanos, y los enzimas cerebrales porcinos son los que están mejor caracterizados respecto a su mecanismo de acción, los que han sido mejor estudiados en relación a su posible implicación en el metabolismo del etanol han sido los enzimas hepáticos de rata. Como ya se ha expuesto, todo tejido estudiado con detenimiento parece contener varios isozimas de ALDH. Así, se ha podido observar que en el hígado de ratas algunos isozimas tienen una alta afinidad por el AcH, mientras que otras formas del enzima tienen una pobre o baja afinidad.

La mayor parte de los investigadores está de acuerdo con la idea de que en la ALDH hepática de rata hay formas mitocondriales, citosólicas y microsomales separadas. En este sentido, Siew y otros (1976) aislaron desde la matriz mitocondrial un enzima y mostraron que poseía una baja Km para el AcH. Como ya se expondrá posteriormente, el AcH se encuentra en cantidades muy pequeñas en el cerebro, de hecho, los niveles de AcH en sangre tienen que

ser al menos de 200 micromolar antes de poder detectar algún AcH en el tejido cerebral (SIPPEL, 1974). De esta forma, no es sorprendente que en el cerebro existan también formas de baja Km del enzima (ERWIN Y DEITRICH, 1966; DUNCAN Y TIPTON, 1971). Así, cada región evaluada del cerebro parece tener al enzima, y este es localizado tanto en regiones mitocondriales como citosólicas (ERWIN Y DEITRICH, 1966; DUNCAN Y OTROS, 1975).

#### **2.4.3.3.- Genética molecular de la ALDH humana.**

El gen de ALDH<sub>1</sub> codifica la mayor ALDH<sub>1</sub> citosólica que existe en el hígado y en otros tejidos. Desde un punto de vista genético su deficiencia tiene una frecuencia baja, menos del 10%, en orientales y caucásicos. Mientras que el gen ALDH<sub>2</sub> codifica la mayor ALDH<sub>2</sub> mitocondrial hepática que posee una baja Km para el AcH. Se ha visto que el alelo atípico de la ALDH<sub>2\*2</sub> es común para el 30% de los orientales, y los sujetos con el alelo ALDH<sub>2\*2</sub> tanto los homocigóticos como los heterocigóticos tienen una ausencia de actividad de la ALDH. Estos sujetos son sensibles al alcohol y tienen un riesgo reducido de padecer daño orgánico relacionado con el alcohol o de desarrollar alcoholismo (YOSHIDA, 1992).

La forma atípica de la ADH, la ADH<sub>2</sub>, que contiene una subunidad beta 2 en lugar de la subunidad beta 1, es sustancialmente diferente de la forma normal en sus propiedades cinéticas además de encontrarse con mayor frecuencia entre los japoneses, chinos y otras poblaciones mongolas comparadas con caucásicos o negros (AGARWAL Y GOEDDE, 1992).

También se ha observado una gran prevalencia para el polimorfismo genético de la ALDH. Así, el 50% de los hígados de japoneses y chinos poseen una ALDH inactiva, el isozima ALDH<sub>2</sub>, mientras que ningún caucásico o negro mostró esa anormalidad (AGARWAL Y GOEDDE, 1992). Un alelo inactivo de la ALDH mitocondrial se asocia con el *flushing* y la ingesta reducida de alcohol, este alelo puede conferir mayor sensibilidad a algunos de los efectos tóxicos del etanol (GOLDMAN Y ENOCH, 1990). En las personas sensibles al alcohol en función de una deficiencia en el alelo del isozima de la ALDH genéticamente controlada esta puede desalentar a los sujetos de ingerir grandes cantidades de alcohol en su vida diaria debido a su reacción adversa al alcohol después de la ingesta de este, y estar de esta forma protegidos contra el alcoholismo (AGARWAL Y GOEDDE, 1987).

En este sentido, la mayoría de los homocigóticos atípicos con ALDH<sub>2\*2</sub> y la mayoría de los sujetos heterocigóticos atípicos ALDH<sub>2\*1</sub> eran alcohólicos que presentaban *flushing* y todos los que tenían la ALDH<sub>2\*1</sub> normal no lo presentaban. Los japoneses con el alelo atípico tienen menor riesgo de desarrollar daño hepático alcohólico que los que tienen el ALDH<sub>2\*1</sub> usual, seguramente en función de su sensibilidad a la intoxicación con alcohol (SHIBUYA, 1993).

Si se toma en conjunto a los orientales que poseen el gen de la ALDH<sub>2</sub> atípica se obtiene que son más sensibles a la respuesta aguda al etanol, tienden a desalentarse de ingerir alcohol y además tienen menor riesgo de desarrollar trastornos o daños relacionados con el alcohol. Los avances recientes en genética molecular pueden posibilitar los estudios sobre el análisis directo del genoma humano (AGARWAL Y GOEDDE, 1992).

#### **2.4.3.4.- Isozimas de ALDH y metabolismo de aminas biogénicas.**

Los sujetos con niveles elevados de AcH generalmente experimentan numerosos efectos tóxicos atribuibles a esta sustancia. Algunos autores han planteado la posibilidad de que los niveles elevados de AcH pudieran explicar una propensión al alcoholismo debida a la producción de niveles elevados de productos de la condensación de las catecolaminas. Se ha observado que los aldehídos producidos por las aminas biogénicas y el AcH formado a partir del etanol pueden reaccionar para formar alcaloides, tales como las tetrahidropapaverolinas (THP) y las tetrahydroisoquinolinas (THIQ) (DAVIS Y WALSH, 1970; COHEN, 1976; COLLINS Y OTROS, 1973; DEITRICH Y ERWIN, 1975; TABAKOFF Y OTROS, 1973; BRIEN Y OTROS, 1983).

Davis y Walsh (1970) sugirieron que las THP, que se forman por la reacción de la dopamina (DA) y el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL), pueden tener un importante papel en los efectos crónicos y adictivos del etanol. El DOPAL se produce en varios tejidos de mamíferos por la deaminación oxidativa de la DA, la serotonina (5-HT) y la noradrenalina (NA). Desde esta postura se plantea que ya que el cerebro es la primera meta para la intoxicación y los efectos adictivos del alcohol, es importante entender la enzimología de la degradación del DOPAL en el cerebro humano. En los estudios que se han realizado con regiones cerebrales de muestras de autopsias para el NAD dependiente de la ALDH, se encontró la actividad de la ALDH con el DOPAL como sustrato en extractos del cuerpo



estriado. La mayor parte de la actividad se encontró en las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólicas pero no se detectaron en la fracción nuclear.

#### **2.4.3.5.- Deficiencia de ALDH en diferentes poblaciones.**

Se han observado diferencias individuales y raciales en la respuesta de euforia y de disforia al alcohol en diferentes grupos étnicos y raciales (WOLFF, 1972; EWING Y OTROS, 1974). Así, un número considerable de sujetos orientales de herencia mongola e indios americanos tienen una mayor respuesta a dosis pequeñas de alcohol comparados con sujetos caucásicos (AGARWAL Y GOEDDE, 1987).

El AcH parece ser el principal responsable de la mayor parte de los síntomas que se observan en orientales e indios americanos en la respuesta de sensibilidad al alcohol. Así, los mayores niveles de AcH se han obtenido en individuos chinos y japoneses que muestran una respuesta de *flushing* tras la ingesta de dosis bajas de alcohol (HARADA Y OTROS, 1981; 1985; GOEDDE Y OTROS, 1983b).

En alrededor del 50% de japoneses y chinos, ha sido detectada y caracterizada bioquímicamente una variante de la ALDH<sub>2</sub>. Mediante electroforesis esta variante exhibe una actividad baja o inexistente en la oxidación del AcH. La variante inactiva se debe a la sustitución de un único aminoácido en la ALDH<sub>2</sub>, la lisina por el glutamato. El alelo que codifica el gen para la lisina es el ALDH<sub>2\*2</sub> mientras que el de la forma glutamato es el ALDH<sub>2\*1</sub>. Los individuos que son heterocigóticos u homocigóticos para el alelo ALDH<sub>2\*2</sub> exhiben el fenotipo deficiente. Por lo tanto, la forma ALDH<sub>2\*2</sub> es la dominante (CRABB Y OTROS, 1983)

Por otra parte, se ha visto que el isozima ALDH<sub>2</sub> no está presente en aproximadamente el 50% de los especímenes de hígado de personas japonesas (GOEDDE Y OTROS, 1979b). Posteriormente se ha confirmado que alrededor del 50% de los hígados de personas chinas también carecen del isozima ALDH<sub>2</sub> (TENG, 1981; RICCIARDI Y OTROS, 1983). En contraste con la amplia prevalencia observada hasta ahora de la deficiencia en ALDH<sub>2</sub>, la variación en el isozima ALDH<sub>1</sub> es menos común (ECKEY Y OTROS, 1986). Además, el examen de extractos de hígado de sujetos caucásicos y orientales ha permitido observar los picos correspondientes a

los isozimas ALDH<sub>1</sub> y ALDH<sub>2</sub>. Sin embargo, los resultados del examen de extractos hepáticos deficientes en ALDH<sub>1</sub> indicaron un pico menor (AGARWAL Y OTROS, 1984).

En cuanto a la frecuencia de la ALDH atípica en diferentes poblaciones se ha visto que entre las muestras seleccionadas, con un promedio de unos 100 sujetos por muestra, no se observa el isozima ALDH<sub>2</sub> atípico en europeos, egipcios o sudaneses, sin embargo, esta sí está presente entre japoneses, vietnamitas o chinos (GOEDDE Y OTROS, 1982) demostrando además que la transmisión de esta característica deficiente está bajo control genético (GOEDDE Y OTROS, 1980; AGARWAL Y OTROS, 1981b).

#### **2.4.3.6.- Isozima atípica de ALDH y sensibilidad al alcohol.**

Los síntomas característicos de la sensibilidad al alcohol, el *flushing* incluyen disforia, enrojecimiento facial, aumento de la temperatura corporal, molestias abdominales, debilidad muscular, vértigo y un incremento en los latidos del corazón (WOLFF 1972, 1973).

Durante unos años se creyó que la llamada ADH atípica, que se encontró con una frecuencia altamente significativa en orientales, podría oxidar el etanol a AcH más rápidamente que la ADH normal y produciría así las reacciones adversas que se observan tras la ingesta de alcohol (STAMATOYANNOPOULOS Y OTROS, 1975). Sin embargo, otros autores (GOEDDE Y OTROS, 1979b) hicieron un planteamiento alternativo al anterior, planteando que la sensibilidad al alcohol observada entre sujetos de raza oriental podría deberse a una incapacidad para metabolizar rápida y efectivamente el AcH como consecuencia de la ausencia de la ALDH<sub>2</sub>. Estas personas podrían ser expuestas a grandes concentraciones de AcH en sangre, llevando a un aumento de las catecolaminas seguido por los síntomas del *flushing*.

Por otra parte, se ha comprobado que esta sensibilidad es más marcada entre orientales e indios americanos frente a europeos y norteamericanos, situándose los porcentajes de frecuencia de sensibilidad en torno al 85-95% y 4-12% respectivamente (WOLFF, 1973).

Además, en función de los datos obtenidos a partir de los estudios con gemelos, adopciones y familias está ampliamente aceptado que la vulnerabilidad al alcoholismo está determinada por factores ambientales y genéticos (AGARWAL Y GOEDDE, 1992).

Otros datos que apoyarían el planteamiento anterior son la existencia de una correlación positiva entre el enrojecimiento facial, aumento de AcH en sangre y deficiencia de ALDH<sub>2</sub> (GOEDDE Y OTROS, 1980). En experimentos en los que se midieron los niveles de etanol y de AcH en sangre se ha obtenido que los niveles de AcH en sangre son significativamente mayores en el grupo de sujetos orientales con ALDH<sub>2</sub> deficiente (34,4  $\mu\text{mol/l}$ ) frente al grupo sin esa deficiencia (2,1  $\mu\text{mol/l}$ ). Sin embargo, los niveles medios de etanol en sangre fueron aproximadamente los mismos (10,3 y 10,93  $\mu\text{mol/l}$ ) en los dos grupos (HARADA Y OTROS, 1981; 1985). Estos datos apoyan la idea (GOEDDE Y OTROS, 1979b) de que es la ALDH más que la ADH la principal responsable del aumento en los niveles en sangre de AcH asociado con los síntomas de *flushing* en orientales (AGARWAL Y GOEDDE, 1987).

#### **2.4.3.7.- Variación de isoenzimas e incidencia del alcoholismo en Japón.**

Como se ha comentado, la deficiencia en ALDH podría dar cuenta de la sensibilidad al alcohol entre los orientales debido a su desajuste sobre la capacidad de oxidar el AcH ya que aproximadamente el 50% de los orientales carecen de actividad en la ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km (HARADA Y OTROS, 1980b; YIN, 1994).

La afirmación de que la deficiencia en el isozima de ALDH<sub>2</sub> tenga un posible papel protector contra el alcoholismo entre los japoneses se apoya en datos en los que se comparan sujetos alcohólicos con pacientes no alcohólicos y sujetos sanos como controles obteniéndose que el porcentaje de deficiencia entre los alcohólicos es del 2% mientras que entre los otros dos grupos se obtiene más de un 40% de sujetos con el isozima deficiente (GOEDDE Y OTROS, 1983a). Además, también se ha informado de que solo un porcentaje pequeño de japoneses carentes de ALDH mitocondrial de baja Km se han encontrado entre los japoneses alcohólicos comparados con el 50% existente en la población total (HARADA Y OTROS, 1983a). Los sujetos con el isozima deficiente podrían desarrollar una aversión fisiológica al alcohol. Además, la incidencia del alcoholismo en Japón es considerablemente menor que en otras ciudades del oeste. Sin embargo, esta asociación necesita mas apoyo desde datos como la medida de los niveles de AcH, los fenotipos de ADH, las reacciones de *flushing* así como la prevalencia del alcoholismo en las poblaciones japonesas y orientales, entre otros.

En este sentido, varios estudios han informado de la correlación existente entre la respuesta de *flushing* y los hábitos de bebida en japoneses, chinos y coreanos (SCHWITTERS Y OTROS, 1982; SUWAKI Y OHARA, 1985; STOIL, 1988). También se ha informado de que los sujetos que muestran un *flushing* rápido consumen menos cantidad de alcohol que los que no lo presentan o que los que lo tienen lento (PARK Y OTROS, 1984).

Al igual que la mayoría de los mongoles como los chinos, los japoneses y los coreanos, los indios americanos son más sensibles al alcohol y muestran *flushing* facial asociado con varios síntomas vasomotores subjetivos y objetivos tras la ingesta de cantidades moderadas de alcohol (WOLFF, 1973).

La proporción de alcoholismo ha sido siempre menor entre los japoneses, los chinos y otros grupos étnicos relacionados con la raza mongola. En este sentido, los individuos con sensibilidad al alcohol en virtud de su deficiencia controlada genéticamente en el metabolismo del alcohol pueden ser desalentados del abuso al alcohol debido a su inicial reacción aversiva.

Todos estos datos son coherentes con la hipótesis de que una hipersensibilidad genética a los efectos del alcohol previene a esos individuos de un alto riesgo de alcoholismo.

#### **2.4.3.8.- Implicaciones de la variación enzimática en el uso y abuso del alcohol.**

Estudios recientes sobre genética humana (YIN, 1994; WHITFIELD, 1994; AGARWAL, 1997) indican que se puede heredar una predisposición al abuso del alcohol y/o al desarrollo del alcoholismo. Desde la genética molecular se ha llamado la atención sobre el importante papel de los enzimas que metabolizan etanol y AcH como son la ADH y la ALDH en el estudio del alcoholismo. En este sentido, se ha visto la existencia de un polimorfismo funcional en algunos genes que codifican estas proteínas de enzimas, esto podría generar una alteración en el rango de síntesis del AcH o disminuir su oxidación posterior. Una selección de este polimorfismo genético podría actuar en algunas poblaciones, como la japonesa, del mismo modo que un factor de protección contra el abuso al alcohol y los daños relacionados con este. En este sentido, los sujetos con una sensibilidad al alcohol controlada genéticamente por la anomalía contenida en su alelo para la ALDH<sub>2\*2</sub> tienen un aspecto positivo frente al consumo excesivo de alcohol. Por otra parte, los sujetos con el genotipo heterocigótico

ALDH<sub>2\*2</sub> (ALDH<sub>2\*1/2\*2</sub>) tienen un mayor riesgo de desarrollar daños en los órganos relacionados con el abuso del alcohol que los sujetos con genotipo homocigótico ALDH<sub>2\*1/2\*1</sub> (AGARWAL, 1997).

Por otra parte, los estudios de familias de sujetos alcohólicos indican que la heredabilidad del alcoholismo es al menos del 50% (FERGUSON Y GOLDBERG, 1997), esto ha generado múltiples investigaciones en un intento de identificación de los marcadores biológicos para determinar el riesgo de alcoholismo; más concretamente, de los marcadores de rasgo, de entre los que cabría destacar los marcadores genéticos. Estos últimos presentan una serie características como son: estar asociados con un subtipo concreto de enfermedad, ser marcadores de estado independiente, ser heredables y segregar con la enfermedad en familiares afectados (CLEMENTE Y SÁNCHEZ-TURET, 1999). Así, los polimorfismos de ADH y de ALDH, más concretamente los genotipos de la ADH<sub>2\*1</sub>, la ADH<sub>2\*2</sub> y la ALDH<sub>2\*2</sub>, parecen conferir un efecto protector frente al riesgo de alcoholismo, sobre todo en sujetos orientales.

#### **2.4.4.- ALDH y otros enzimas como marcadores del riesgo de alcoholismo.**

El interés por los marcadores se deriva de un interés por la prevención primaria ya que esta posibilidad permite diagnosticar la enfermedad en estadios iniciales más reversibles. En este sentido, la idea de la posible existencia de un determinante genético para la ingesta de alcohol y su abuso subsiguiente ha llevado a la búsqueda de un marcador biológico para el alcoholismo.

Como marcadores genéticos de la predisposición al abuso del alcohol y al alcoholismo se han sugerido varios genes específicos, entre ellos están los enzimas que metabolizan alcohol como son la ADH y la ALDH (AGARWAL Y GOEDDE, 1992).

Varios estudios ponen de manifiesto que los eritrocitos poseen una actividad significativa de la ALDH (MARING Y OTROS, 1982; INOUE Y OTROS, 1982). La ALDH eritrocitaria parece ser similar a la ALDH mitocondrial de baja Km. Algunos autores (TOWELL Y OTROS, 1986) han observado que la expresión de la actividad de la ALDH eritrocitaria en términos de hemoglobina es preferible a la expresión en términos de volumen de eritrocitos. Se ha observado un decremento significativo en la actividad del isozima de ALDH eritrocitaria de alcohólicos crónicos cuando se compararon con sujetos sanos, pacientes psiquiátricos no alcohólicos y sujetos no alcohólicos que presentaban daño hepático (AGARWAL Y OTROS, 1982b). En la comparación de sujetos sanos con otros que abusaban del alcohol se obtuvo

que en estos últimos la media de la ALDH eritrocitaria era un 30% menor (TOWELL Y OTROS, 1986). Según esto la medida de la ALDH en los eritrocitos podría servir como marcador bioquímico del alcoholismo.

Otro grupo de marcadores son los relacionados con otras enzimas y vías de neurotransmisores. Así, entre los individuos caucásicos que abusan del alcohol y en sus familiares de primer grado se ha detectado una menor actividad de la monoamino oxidasa (MAO). También se observa una menor actividad de la adenilato ciclasa seguramente como resultado de la inhibición de la proteína G. Hay marcadores relacionados con vías serotoninérgicas, muscarínicas y dopaminérgicas. En este último grupo de marcadores, se ha visto también una asociación entre la herencia del alelo A1 del receptor D<sub>2</sub> de la DA y la susceptibilidad al alcoholismo. Además, las características electrofisiológicas de los alcohólicos y de los sujetos con riesgo de desarrollar alcoholismo han sido identificadas e incluyen una menor amplitud de los potenciales cerebrales evocados y, después de la ingestión de etanol, una actividad del electroencefalograma (EEG) característica con ondas alfa (FERGUSON Y GOLDBERG, 1997)

También se ha propuesto a la catalasa eritrocitaria como un marcador biológico de la afinidad del organismo para ingerir alcohol (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; AMIT Y ARAGÓN, 1988) ya que se ha observado que la actividad de la catalasa en sangre presenta una correlación significativa y positiva con el consumo posterior de etanol en ratas que no han tenido experiencia previa con el alcohol.

Así, los datos obtenidos con sujetos humanos apoyan la idea de que la catalasa eritrocitaria podría ser un buen marcador de la propensión de los organismos a consumir alcohol. En este sentido se ha obtenido (KOECHLING Y OTROS, 1995) que los sujetos con historia familiar de alcoholismo (FH<sup>+</sup>) presentan mayor actividad de la catalasa que los sujetos que no tienen una historia familiar de alcoholismo (FH<sup>-</sup>). De este modo, la relación entre catalasa e ingesta de alcohol para el primer grupo (FH<sup>+</sup>) fue significativamente mayor comparada con los sujetos (FH<sup>-</sup>).

La actividad de la ALDH en sangre también ha sido propuesta como un posible marcador para la detección del alcoholismo (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983).

También se ha planteado que la catalasa cerebral y la ALDH, los enzimas que controlan la producción y la eliminación del AcH en el cerebro podrían representar un sistema de marcadores biológicos subyacentes a la afinidad de los animales para consumir etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1985). Los datos que demuestran que los niveles de actividad de estos enzimas están positivamente correlacionados con la ingestión de alcohol parecen sugerir que es probable que la actividad del enzima pueda servir como un predictor de la propensión a beber alcohol.

Otros autores han implicado al AcH como posible marcador biológico para el alcoholismo (GOEDDE Y OTROS,1979b;1983a, HARADA Y OTROS,1983b; SCHUCKIT, 1980), más concretamente las concentraciones de AcH ligeramente elevadas.

Como puede observarse, los marcadores propuestos son múltiples, sin embargo, estudios recientes, plantean que el peso de la evidencia derivada de los estudios con animales y humanos utilizando aproximaciones genéticas, bioquímicas y conductuales lleva a proponer la actividad de la catalasa cerebral como marcador de la propensión de los organismos a la ingesta voluntaria del alcohol –no al alcoholismo– (SMITH Y OTROS,1997).

#### **2.4.5.-Inhibidores de la ALDH.**

A continuación se presenta un breve resumen de los inhibidores del enzima ALDH, la selección de los mismos se ha basado en 2 criterios, por una parte, el grado de utilización clínica y experimental y, por otra, la eficacia o potencia en la inhibición del enzima.

Algunas de las sustancias que se utilizan en la terapia farmacológica para el tratamiento del alcoholismo tienen una característica básica común que determina la utilización como candidata a este tratamiento; esta característica es la inhibición de la ALDH. Por su parte, algunos autores (BRIEN Y LOOMIS, 1985; GIANOULAKIS Y WAELE, 1994)han planteado una serie de características para los fármacos utilizados en el tratamiento del alcoholismo, estas características serían las siguientes:

-La generación de una prevención en el desarrollo del alcoholismo en los sujetos de alto riesgo.

- Una inhibición altamente selectiva para la ALDH hepática sin inhibir a otros enzimas, además, podría inhibir preferentemente la ALDH hepática de baja  $K_m$ . Esta segunda característica es importante ya que cuando está inhibida la ALDH hepática de baja  $K_m$ , las concentraciones de AcH hepático y sanguíneo aumentan. La magnitud de este incremento no solo está determinada por el rango de formación de AcH y la extensión de la inhibición de la baja  $K_m$ , sino también por la actividad de la ALDH de alta  $K_m$ . Si ambos tipos están inhibidos, se obtendrían elevaciones de AcH de manera persistente tras la ingesta de etanol que serían los responsables de la producción de los cambios cardiovasculares y la hepatotoxicidad en el paciente.

- Un comienzo rápido para proporcionar una protección inmediata frente al posterior consumo de etanol que lleve a un bloqueo en la progresión del alcoholismo en las etapas tempranas de la enfermedad.

- Así como una inhibición del enzima lo suficientemente duradera como para permitir una administración diaria de la droga o menos.

- El mecanismo de inhibición de la ALDH no debería ser irreversible para no necesitar una nueva síntesis de proteínas para tener el enzima activo de nuevo.

- Con un nivel de toxicidad bajo y un alto índice terapéutico para su uso clínico que implique una mejora en sus resultados a largo plazo.

Si se tienen en cuenta las características anteriores, el número de inhibidores útiles en la práctica clínica se reduce considerablemente disulfirán, cianamida, y nitrefazol, entre otros.

Así, el inhibidor competitivo *in vitro* más potente de la ALDH es el tricloroacetaldehído o cloral hidrato. La constante de inhibición ( $K_i$ ), para este compuesto se encuentra en el rango de 1-10 micromolar para las diferentes formas del enzima (SIEW Y OTROS, 1976).

El 3-bromoacetilpiridinobutil y el 3-bromoacetilpiridinopentildifosfoadenosina son eficientes inactivadores de varias deshidrogenasas dependientes del NAD, incluyendo las ALDH del hígado.



Otros compuestos son conocidos inhibidores de la ALDH. Quizá el más estudiado es el disulfirán. Un segundo compuesto que también se utiliza en el tratamiento clínico del alcoholismo es la cianamida (Temposil®) (KITSON, 1977a). El efecto clínico de las drogas utilizadas en el tratamiento del alcoholismo está basado en una reacción aversiva inducida por el incremento en los niveles de AcH tras la ingestión de etanol, ya que se ha visto que aunque disulfirán y cianamida no tienen una estructura química común, en los sujetos humanos o en los animales experimentales pretratados con estos dos inhibidores, se altera la biotransformación del etanol, lo cual genera una acumulación de AcH en el hígado y en la circulación sanguínea sistémica que podría desalentar al posterior consumo de etanol (BRIEN Y LOOMIS, 1983). Este hecho ha posibilitado que para algunos autores (LARSON Y OTROS, 1992; BREWER, 1993; KRISTENSON, 1995; FINNEY Y MONAHAN, 1996) estos fármacos constituyan uno de los pocos tratamientos efectivos para el alcoholismo.

#### **2.4.5.1.- Disulfirán.**

El disulfirán ha sido, y es, ampliamente utilizado como un agente aversivo frente al alcohol porque inhibe la oxidación del acetaldehído llevando así a diferentes reacciones tóxicas (CHICK Y ERIKSON, 1996). Los síntomas de la llamada Respuesta Etanol-Disulfirán (RED) son muy parecidos a los síntomas de la sensibilidad al alcohol asociados con la deficiencia en el isozima ALDH<sub>2</sub>.

Una propiedad común de todas las ALDH conocidas es su sensibilidad al oxígeno y todas tienen al menos un residuo altamente reactivo de cisteína. En el caso de la ALDH dependiente de NAD se logra una oxidación similar con disulfirán. Este reactivo, un carbamil disulfido sustituido, en un primer paso causa un intercambio disulfídico con el grupo sulfidrilo (SH) reactivo de la ALDH y tras este se produce la liberación del ácido ditiocarbámico y la formación concomitante de un puente de cistina. La modificación de las cisteínas residuales de la ALDH por los reactivos del grupo sulfidrilo iodoacetato, disulfirán o los iones de mercurio (Hg<sup>++</sup>) se acompaña parcial o totalmente de la pérdida de la actividad enzimática (HEMPEL Y OTROS, 1980). Además, como ya se comentó anteriormente, estas cisteínas podrían ser las partes constitutivas del lugar activo de los enzimas.

En algunos estudios *in vitro* se ha obtenido que el enzima citosólico hepático de diferentes especies animales como por ejemplo los ovinos (KITSON, 1975) y los caninos

(SANNY Y RYMAS, 1993) es más reactivo al inhibidor que los enzimas de la mitocondria. Este es un hallazgo inesperado ya que la mayor parte del AcH es metabolizado en la mitocondria.

El disulfirán como inhibidor de la ALDH hepática produce una inhibición irreversible de este enzima (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978) con un comienzo lento, 12horas, y cuya acción es de larga duración, 6-10 días, en humanos.

El disulfirán no es un inhibidor selectivo de la ALDH ya que inhibe también a la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1979) y al citocromo P-450 microsomal hepático. Sin embargo, *in vitro* el disulfirán inhibe principalmente al isozima de alta Km (GREENFIELD Y PIETRUSZKO, 1977; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978). Esta discrepancia se puede resolver ya que tras el estudio de las propiedades inhibitorias de los productos resultantes de la degradación del disulfirán, se ha obtenido que el dietilamino inhibía principalmente al isozima II de la ALDH con una baja Km para el AcH (HARADA Y OTROS, 1982). Es probable que *in vivo* el dietilamino inhiba al isozima ALDH<sub>2</sub> generando una acumulación de AcH, de esta forma puede existir un mecanismo subyacente común para la RED y para la sensibilidad al alcohol en los orientales con una ALDH<sub>2</sub> deficiente.

#### **2.4.5.2.- Cianamida.**

Se sabe que la cianamida *in vivo* es un potente inhibidor de la ALDH hepática de ratón. A diferencia del disulfirán, que produce inhibición tanto *in vivo* como *in vitro*, la cianamida parece incapaz de inhibir la ALDH *in vitro*, en ALDH purificada, ejerciendo su inhibición sólo *in vivo* (DEITRICH Y OTROS, 1976; DEMASTER Y OTROS, 1982). Sin embargo, respecto a este último punto existe cierta controversia porque se ha obtenido también que la ALDH mitocondrial de baja Km es inhibida por la cianamida *in vitro* (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976b; 1978).

Para ser una especie inhibitoria, este compuesto parece requerir, la activación enzimática de la carbimida, que es el producto hidrolítico del calcio carbimida, generando una inhibición reversible del enzima (LOOMIS Y BRIEN, 1983a). Sin embargo, los datos con diálisis sugerirían

que la inhibición que resulta de su acción es irreversible (DEITRICH Y OTROS, 1976) ya que mediante esa técnica no se logra revertir la inhibición.

Los estudios con humanos ponen de manifiesto que el comienzo de la inhibición que esta droga lleva a cabo es rápido, 1 hora (OBACH Y OTROS, 1986), el curso temporal de la concentración de cianamida en el plasma humano, tras la administración oral de dosis terapéuticas de esta droga (1 mg/kg), indican que está presente en plasma al menos durante 8 horas, siendo la vida media de este compuesto de 2 horas (PRUÑONOSA Y OTROS, 1986), en cuanto a la duración de la acción se ha visto que es aproximadamente de unas 24 horas (DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1978).

Al contrario que el disulfurán, no inhibe la DBH ni al citocromo P-450 microsomal hepático (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1979), pero sí la actividad catalítica de la catalasa (SHIROTA Y OTROS, 1987a, b; 1996). Además de no inhibir sólo la ALDH de baja Km sino también la de alta Km (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; BRIEN Y OTROS, 1985).

#### **2.4.5.3.- Coprina.**

Muchos otros compuestos tienen la habilidad de inhibir a la ALDH. Entre ellos, la coprina (*Coprinus atramentarius*) o N-5(1-hidroxiciclopropil) glutamine, un compuesto localizado en algunos champiñones o setas, también inactiva a la ALDH (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982). Parece ser que, al igual que en el caso de la cianamida, necesita convertirse en un compuesto modificado que inhiba al enzima. Este compuesto farmacológicamente activo es el 1-aminociclopropanol (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978).

En la rata, al igual que la cianamida tiene un rápido comienzo y de la misma forma que el disulfirán una inhibición de larga duración. Se ha visto que este compuesto genera una inhibición irreversible dosis dependiente de la ALDH de baja Km sin afectar a la ALDH de alta Km (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978) ni a la DBH (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1979). Sin embargo, su uso no se ha extendido ya que se ha observado que es tóxico en los animales experimentales.

#### **2.4.5.4.- Pargilina y Reserpina.**

La pargilina y la reserpina, dos compuestos empleados a menudo en el estudio de los neurotransmisores, también han demostrado ser inhibidores *in vivo* de la ALDH. En este sentido, se ha obtenido que la pargilina inhibe la ALDH hepática alrededor de un 58% (DEMBIEC Y OTROS, 1976; FERENCZ-BIRO Y PIETRUSZKO, 1984b). Aunque para ejercer esta inhibición *in vivo* sobre la ALDH, la pargilina, requiere de una depropargilación metabólica para ejercer su acción (SHIROTA Y OTROS, 1980).

#### **2.4.5.5.- Metiltetrazoletiol.**

Este compuesto es el lugar activo de los antibióticos cefalosporinos, como el cefamandole, el cefoperazone o el latamoxef (MATSUBARA Y OTROS, 1986; KLEIN Y CUNHA, 1995). Es el responsable de una reacción similar a la reacción producida por el disulfirán en los sujetos que ingieren alcohol mientras toman estos antibióticos (BUENING Y WOLD, 1982). Este inhibidor produce una inhibición selectiva de la ALDH de baja  $K_m$ , con un rápido comienzo y una inhibición de larga duración (BRIEN Y OTROS, 1985). Tanto la inhibición de la ALDH como el aumento de los niveles de AcH en sangre son dosis dependiente. Sin embargo, la elevación de los niveles de AcH en sangre es menor que la que genera la cianamida.

#### **2.4.5.6.- Nitrefazol.**

Junto con el disulfirán en Estados Unidos y la cianamida en Europa, el nitrefazol es otro de los agentes utilizados para inducir aversión al alcohol mediante la generación de náuseas y otras sensaciones desagradables cuando su administración se realiza al mismo tiempo que el consumo de alcohol (GATCH Y LAL, 1998).

Esta sustancia ha demostrado en diferentes estudios (KODA Y OTROS, 1984; ZORZANO Y HERRERA, 1990a, b; VERBANK, 1995) con ratas y humanos que produce una inhibición irreversible de la ALDH de baja  $K_m$ , con un rápido comienzo y una prolongada duración de la inhibición. Sirva a modo de ejemplo que en un estudio realizado con sujetos humanos la duración fue de 7 días, además, los datos indicarían que la inhibición que produce es mayor que la producida por dosis similares de disulfirán. Al igual que en el caso del metiltetrazoletiol nos encontramos con una inhibición y un incremento del AcH en sangre que son dosis dependiente, y al igual que la cianamida, no inhibe la DBH.

En relación con el alcohol, se ha investigado (SUOKAS Y OTROS, 1985) el efecto del etanol tras el pretratamiento con nitrefazol, los datos indicaron un aumento en los niveles de AcH tras la administración de etanol, así como en la temperatura de la piel y en el rango cardíaco, al mismo tiempo se generó una disminución en la presión sanguínea distólica y en la resistencia periférica total.

A modo de resumen cabría señalar que el polimorfismo genético de los enzimas implicados en el metabolismo del alcohol es importante para determinar el rango del metabolismo del etanol y el de sus respuestas fisiológicas. Así, la deficiencia en el isozima ALDH<sub>2</sub> que genera una acumulación de AcH en la sangre da como resultado una vasodilatación asociada con los síntomas desagradables o disfóricos observados tras la ingesta de alcohol. Esta deficiencia enzimática genera un aumento en los niveles de AcH en sangre tras la ingestión de etanol que parece ser el responsable de la reacción de *flushing* observada entre los japoneses. Por lo tanto, todo lo anterior pone de manifiesto la relevancia de la ALDH<sub>2</sub> de baja Km hepática en la oxidación hepática del AcH derivado de la ingesta de etanol en humanos.

En los apartados que se presentan a continuación se expondrán los datos existentes acerca de los enzimas presentes a nivel central que pueden estar implicados en el metabolismo de esta sustancia así como las pruebas de la existencia de AcH formado centralmente y su posible mediación en algunos de los efectos psicofarmacológicos atribuidos al etanol.

### **III. METABOLISMO CENTRAL DEL ETANOL.**

#### **1.- Pruebas para la existencia de un metabolismo central del etanol.**

A pesar de los datos obtenidos a favor de los efectos reforzantes del AcH no se ha aceptado totalmente la idea de una mediación o implicación del AcH en algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol. De hecho, en la actualidad, este aspecto sigue siendo motivo de controversia.

El apoyo a este planteamiento presenta una serie de dificultades entre las que cabe destacar la dificultad de detectar AcH tras la exposición del organismo a la ingesta de cantidades normales de etanol (ERIKSSON, 1980) ya que el metabolismo hepático del AcH mediante la ALDH no permite que con un consumo moderado de etanol prácticamente ningún AcH escape del hígado y alcance el sistema nervioso central (SNC). Además, se ha planteado la existencia de una barrera enzimática cerebral al AcH presente en la sangre y formada por la ALDH (SIPPEL, 1974; ZIMATKIN, 1990; 1991), de tal forma que el cerebro estaría protegido de ese AcH formado en la periferia del organismo que pudiera escapar del hígado, al menos en concentraciones moderadas.

Este aspecto nos lleva a una cuestión de gran importancia, si el AcH no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) debido a la presencia de ALDH, cómo puede entonces ser responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Como forma de resolver este problema se ha planteado (SMITH Y OTROS, 1997; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997) que es necesario que el AcH se forme directamente en el cerebro para así intentar adscribirle la paternidad de las propiedades psicofarmacológicas del etanol.

Este metabolismo central del etanol requeriría la existencia de la maquinaria enzimática necesaria para su oxidación y posterior degradación de sus metabolitos.

Así, la acumulación central podría ser el resultado de la oxidación del etanol directamente en el cerebro. En el punto siguiente se presentarán las pruebas a favor de la localización central del AcH a partir del metabolismo del etanol en el SNC.

## **2.- Sistemas enzimáticos.**

Respecto a las herramientas enzimáticas necesarias para metabolizar etanol a nivel central se sabe que el cerebro posee los enzimas necesarios para la formación y degradación del AcH.

Así, la ADH III, por su parte, ha mostrado solo una débil capacidad de oxidar etanol en el cerebro (BEISSWENGER Y OTROS, 1985). Del MEOS, y más concretamente del P-450 también ha sido establecida su presencia en el cerebro (SOHDA Y OTROS, 1993) y en cultivos primarios de astrocitos (MONTOLIU Y OTROS, 1995). Del sistema catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sabemos que también está presente (ARAGÓN Y OTROS, 1992a; ZIMATKIN Y LINDROS, 1996) y que puede oxidar etanol (COHEN Y OTROS, 1980). Sin embargo no tiene una distribución homogénea (BRANNAN Y OTROS, 1981) y puede no estar presente en los astrocitos (ASPERG Y OTROS, 1993).

En los apartados siguientes se expondrán los datos que indicarían que el AcH puede ser formado directamente en el tejido cerebral y que los enzimas responsables de su formación y degradación en el cerebro tienen una función reguladora en las conductas inducidas por etanol, como por ejemplo en el consumo voluntario de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1985b). Estos hallazgos proporcionan una clara evidencia de la implicación del AcH central en la mediación de las propiedades psicofarmacológicas del etanol.

### **2.1.- Alcohol deshidrogenasa (ADH): Localización cerebral.**

Como se ha comentado anteriormente la conversión de etanol a AcH la catalizan tres sistemas enzimáticos generales como son la ADH, el citocromo P-450 y la catalasa.

La presencia de la actividad específica de la ADH en el cerebro fue demostrada por primera vez por Raskin y Sokoloff (1968) que incrementaron la actividad del enzima emparejando la oxidación de etanol a AcH con la reducción de lactaldehído a 1,2 propanediol. Los primeros estudios que se realizaron para la detección de ADH en el cerebro indicaron la existencia de muy poca actividad de este enzima en el cerebro (RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972) o de AcH en el fluido cerebroespinal de sujetos alcohólicos intoxicados (LINDROS Y HILLBOM, 1979). Estos datos han generado que durante mucho tiempo haya sido discutida la existencia de una cantidad significativa de ADH en el cerebro.

Más tarde, experimentos con inmunohistoquímica permitieron la detección de ADH en el citoplasma de algunas neuronas de la corteza cerebral, sobre todo en los cuerpos mamilares, la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo, el tallo infundibular de la pituitaria y en células de Purkinje del cerebelo (BÜHLER Y OTROS, 1983; KERR Y OTROS, 1989).

En cerebro bovino, las regiones que presentaban actividad de la ADH fueron en orden decreciente (CHERNIKEVICH Y OTROS, 1984):

- cerebelo
- sustancia blanca de los hemisferios
- sustancia gris y
- subcórteX.

En 1975 se aisló ADH del cerebro de rata (TABAKOFF Y VON WARTBURG, 1975), el peso molecular del enzima de la ADH aislada por Tabakoff y Von Wartburg, (1975) era de unos 80.000, mostrando la actividad máxima a un pH de 9.8 y una inhibición del 98% de su actividad por 1mM de pirazol, estos datos son similares a los encontrados para el hígado

La actividad específica de la ADH cerebral purificada, determinada por la producción de NADH, fue igual a 0.06 nmol/min/mg de proteína y la habilidad máxima del cerebro para oxidar etanol, calculado a un pH fisiológico, fue de alrededor de 0.4 nmol/min/g de cerebro (VON WARTBURG Y OTROS, 1975).

El enzima se encontró en el citosol y el núcleo, pero no se detectó en los microsomas o mitocondrias, esta localización por tanto está limitada al citoplasma neuronal y solo para algunas neuronas. La restricción del enzima a un pequeño número de neuronas en el SNC puede ayudar a explicar la dificultad en demostrar la existencia del enzima en la totalidad de los homogenados cerebrales. Además, podría indicar que la actividad de la ADH a nivel local de las neuronas puede ser importante aunque a nivel global su actividad sea baja.

De la ADH existen varios isozimas que se diferencian por su afinidad por el etanol y la facilidad con la que el isozima puede ser inhibido por el pirazol (VALLEE Y BAZZONE, 1983). La significación de la localización de la ADH depende de los isozimas que estén presentes. Por otra parte, los informes sobre la proporción del enzima en el cerebro no han sido consistentes.



Así, algunos estudios han encontrado isozimas con una alta  $K_m$ , aproximadamente de 0,15mM, para el etanol (BÜHLER Y OTROS, 1983) y otros con una baja  $K_m$ , mayor de 500mM, en varias especies animales incluyendo a los humanos (ROUT, 1992; GIRI Y OTROS, 1989; JULIA Y OTROS, 1987). Esto pone de manifiesto que las concentraciones de etanol en el cerebro deben ser muy altas antes de que la ADH pueda desempeñar una función en la conversión de etanol a AcH.

En el cerebro humano la única forma presente de ADH en cantidades significativas es la clase III de la ADH. Este enzima ha sido identificado, aislado y caracterizado, y sus propiedades son idénticas a las de la misma forma de ADH del hígado y de la placenta.

La clase III de la ADH está ampliamente distribuida en el cerebro, sobre todo concentrada en la capa subependimal y las áreas perivasculares, esto se observó en el córtex cerebral, el subcórtex, el tallo cerebral y el cerebelo (GIRI Y OTROS, 1989). Entre sus características presenta una afinidad muy baja por el etanol y, como consecuencia de esto, las oportunidades para la oxidación del etanol son bastante limitadas ( $K_m$  mayor de 2,5 M). De hecho, esta concentración no se puede lograr en el cerebro ni siquiera bajo una intoxicación severa con etanol (GIRI Y OTROS, 1989).

La presencia de ADH III con propiedades similares también se ha demostrado, mediante procedimientos bioquímicos e inmunocitoquímicos, en el citoplasma y el núcleo de las células del cerebro de rata (BUHLER Y OTROS, 1983; IBORRA Y OTROS, 1992). En este sentido, se ha obtenido que (DUNCAN Y OTROS, 1976), usando anticuerpos contra la ADH de hígado de rata, una proteína de hígado y de cerebro de rata comparten antígenos comunes.

La actividad de la ADH se encontró en capilares sanguíneos, astrocitos y neuronas de varias regiones cerebrales, la máxima actividad del enzima se vió en la células de Purkinje del cerebelo, las neuronas motoras y algunas neuronas colinérgicas y aminérgicas del tallo cerebral. Sin embargo, la actividad de la ADH con el etanol como sustrato no fue detectada en el cerebro por histoquímica.

Así, por una parte encontramos que la ADH III no parece tener parte en el metabolismo del etanol, sirva como ejemplo que la actividad de la ADH cerebral bovina fue la cuatromilésima parte de la actividad de ese enzima en el hígado (CHERNIKEVICH Y OTROS, 1984) y, por otra, los datos indican que la ADH I parece estar ausente del cerebro humano. Sin

embargo, no se excluye la posibilidad de que la ADH oxide etanol en algunas células específicas del cerebro. Así, la ADH cerebral puede actuar como una reductasa, reduciendo el AcH, producido por el citocromo P-450 o por la catalasa *in situ*, a etanol y también eliminar el excedente de AcH en las células que poseen una baja actividad de la ALDH (CHERNIKEVICH Y OTROS, 1984).

Además, los estudios realizados con diferentes cepas de ratones han puesto de manifiesto que la actividad de la ADH en el estriado fueron mayores en los ratones C57BL comparados con una cepa de ratones albino. Además, en ambas cepas de ratones el córtex cerebral, el estriado, el cerebro medio y el cerebelo fueron capaces de oxidar etanol vía el sistema de la ADH (MESSIHA, 1985).

Quizá una de las posibles funciones de la ADH cerebral sea la oxidación de alcoholes grasos de larga cadena (GIRI Y OTROS, 1989). La clase III de la ADH es idéntica a una deshidrogenasa de formaldehído dependiente de glutatona (KOIVUSALO Y OTROS, 1989). Además, una ADH con propiedades similares ha sido encontrada en el cerebro de ratón (ROUT, 1992). Por otra parte, la ADH de mamíferos también ha mostrado su función en la conversión de retinol a retinaldehído el cual es convertido a ácido retinóico, por la ALDH, que desempeña un papel en el desarrollo del tubo neural en los embriones de vertebrados (DUESTER, 1991). Así, los defectos del tubo neural inducidos por el etanol, pueden ser debidos a la oxidación del retinol por la inhibición del etanol (SHEAN Y DUESTER, 1983; DUESTER, 1994). La presencia de ADH III, deshidrogenasa de formaldehído dependiente de glutatona, en el cerebro podría reflejar la necesidad de una sustancia que actúe como neutralizador del formaldehído para la citoprotección (HOOG Y OTROS, 1994).

## **2.2.- Citocromo P-450 2E1: Localización cerebral.**

La presencia de CYP-450 en el cerebro fue observada por primera vez por Sasame y otros, (1977). Más tarde, la habilidad para metabolizar xenobióticos se demostró para cerebro de ratón (RAVINDRANATH Y ANANDATHEERTHAVARADA, 1989), de rata (NASLUND Y OTROS, 1988) y de sujetos humanos (RAVINDRANATH Y OTROS, 1989; GHERSI-EGEA Y OTROS, 1993). También se ha establecido que en el cerebro de rata había varias formas de CYP-450 aunque estas estaban presentes en cantidades muy pequeñas si se calculan por gramo de tejido (NASLUND Y OTROS, 1988; WARNER Y GUSTAFSSON, 1994).

Sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos ponen de manifiesto la presencia de un amplio número de formas del CYP-450 en varias poblaciones de la glía y de las células nerviosas y en varias regiones del cerebro, mostrando que las células individuales pueden contener cantidades significativas de estas enzimas (KHOLER Y OTROS, 1988; WARNER Y OTROS, 1988).

Como se expuso anteriormente la forma específica del citocromo P-450 relacionada más directamente en el metabolismo del etanol es el CYP-450 2E1. Este isozima oxida activamente al etanol y, además, es inducido en el hígado de rata después de la administración de alcohol. El citocromo P-450 2E1 fue encontrado en el cerebro por Morgan y otros, (1982) así como otros citocromos del P-450 que se han encontrado e identificado en el cerebro. Se pueden encontrar en todos los tipos de células gliales, cuerpos, fibras y terminales de células nerviosas y vasos sanguíneos de todas las regiones cerebrales (HANSSON Y OTROS, 1990; WARNER Y GUSTAFSSON, 1994). La máxima inmunoreactividad se detectó en las neuronas piramidales del córtex frontal y el hipocampo, en los cuerpos de las neuronas y los neuropilos del estriado, en neuronas de la sustancia negra, núcleo pontino, núcleo olivar superior, núcleo de los nervios trigémino y facial, sustancia gris central y en la formación reticular.

Aunque la catalasa parece ser una fuente de parte del AcH sintetizado después del consumo de etanol, no se puede obviar un papel para el citocromo P-450 2E1, especialmente durante la exposición crónica al etanol. En este sentido, el tratamiento crónico con alcohol generó una inducción de la actividad del enzima en los microsomas cerebrales de ratas lo cual podría llevar a un incremento en el metabolismo del etanol a AcH y dañar las estructuras cerebrales (ANANDATHEERTHAVARADA Y OTROS, 1993).

La inducción de CYP 2E1 en el cerebro de rata tras el tratamiento crónico con alcohol también ha sido mostrada por Montoliu y otros, (1994) esta inducción se asoció con la peroxidación de lípidos y posiblemente con los efectos tóxicos del etanol y las alteraciones de la membrana. Sohda y otros, (1993) demostraron el incremento claro del CYP 2E1 pero no del contenido de los CYP 1A1 ni del 2B1 en los ganglios basales, en la corteza cerebelar, la sustancia negra y el hipocampo. La inducción se ha visto también tras el tratamiento agudo con etanol (WARNER Y GUSTAFSSON, 1994; TINDBERG E INGELMAN-SUNDBERG, 1996). Después de una única dosis de etanol (0.8 ml/kg) administrado por vía intraperitoneal (i.p.), el

contenido del P-450 del cerebro de rata se incrementó desde 62 a 230 pmol/g de tejido. Se ha obtenido también que la administración crónica de etanol generó una inducción del doble del contenido total de P-450 y de la actividad de la monooxigenasa, que está mediada por el P-450 2E1 (BHAGWAT Y OTROS, 1995).

Como se ha visto, el citocromo P-450 2E1 puede ser inducido en el cerebro por etanol. Sin embargo, uno de los puntos débiles de los estudios publicados es que no estudian el curso temporal de esta inducción. Sin embargo, incluso con una inducción significativa, aún necesitaría ser establecida una ruta de síntesis que lleve a concentraciones significativas de AcH en el cerebro (HUNT, 1996).

A modo de conclusión cabría plantear que aunque no hay duda de la presencia del CYP 2E1 en las estructuras cerebrales, de su inducción por el tratamiento con alcohol y de la contribución potencial para la neurotoxicidad del etanol a través de la producción de radicales libres; sin embargo, su papel actual en el metabolismo del etanol y su acción en el cerebro no está clara.

### **2.3.- Catalasa encefálica.**

#### **2.3.1.- Localización cerebral.**

La catalasa es un enzima tetramérico presente en todos los tejidos aeróbicos existentes, su función principal es eliminar la intoxicación provocada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (YASMINEH Y THEOLOGIDES, 1993), que se forma por la actividad de los enzimas respiratorios catalizando su descomposición en agua y oxígeno molecular. A diferencia de las peroxidasas, para llevar a cabo su función, no depende de un aceptor de oxígeno, presentando un grupo hemo como grupo prostético en cada subunidad.

La presencia de catalasa en regiones cerebrales ha sido estudiada bioquímica, histoquímica e inmunohistoquímicamente en adultos (McKENNA Y OTROS, 1976; GAUNT Y DE DUVE, 1976; BRANNAN Y OTROS, 1981; ZIMATKIN Y LINDROS, 1996), en cerebros en desarrollo (ARNOLD Y HOLTZMAN, 1978) y en cultivos de células cerebrales de ratas fetales (ASPBERG Y TOTTMAR, 1992; 1994; ASPBERG Y OTROS, 1993; HAMBY-MASON Y OTROS, 1997).

En el cerebro, la actividad de la catalasa se localiza en pequeños orgánulos celulares, los microperoxisomas (NOVIKOFF Y NOVIKOFF, 1973; MCKENNA Y OTROS, 1976; HOLTZMAN, 1982) principalmente en los pericariones de las neuronas aminérgicas (ZIMATKIN Y LINDROS, 1996).

La máxima actividad de la catalasa se encontró en la región del núcleo del tracto solitario, cerca del área postrema donde las neuronas de NA y las de epinefrina están situadas, en el núcleo del rafe dorsal y en el núcleo arqueado del hipotálamo. En estas regiones más de la mitad de las neuronas son catalasa positivas y en algunas de ellas la densidad de las mismas es mayor que en los hepatocitos. También se encontró actividad de la catalasa en la sustancia blanca de las células gliales de todas las regiones cerebrales, la máxima concentración se observó en los endotelios que recubren el tercer ventrículo, especialmente en la zona cercana a la eminencia media (ZIMATKIN Y LINDROS, 1994; 1996).

Así, teniendo en cuenta que las células positivas para la catalasa se encuentran solo en una pequeña parte del conjunto cerebral, estos datos pueden explicar la baja actividad de la catalasa que se ha encontrado en los homogenados cerebrales totales (GAUNT Y DE DUVE, 1976; ARAGÓN Y OTROS, 1992a; GILL Y OTROS, 1992).

Zimatkin y Lindros (1996) realizaron un estudio, mediante histoquímica e inmunohistoquímica, para determinar el desequilibrio existente entre la producción y la eliminación de AcH a partir del etanol. Los resultados obtenidos indican que la localización de la actividad de la catalasa contrasta con la que muestra la ALDH (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1995) ya que esta presenta una amplia distribución en las estructuras cerebrales al mismo tiempo que presenta una baja actividad en los pericariones de las neuronas aminérgicas, especialmente las catecolaminérgicas tanto en cerebro de rata (ZIMATKIN, 1990; 1991) como en humanos (MOTAVKIN Y OTROS, 1990). Estos datos indicarían que la oxidación del etanol a AcH mediada por la catalasa acontece principalmente en neuronas aminérgicas. Sin embargo, y como no se conocen los niveles mínimos necesarios de AcH en el cerebro para ejercer sus efectos, aunque en principio los datos indiquen que la cantidad total de AcH formado a partir de la catalasa encefélica es pequeña, esto no invalida la posibilidad de que se den concentraciones suficientes de AcH que permitan modificaciones en determinados centros cerebrales implicados en el reforzamiento.

En este sentido, por parte de algunos autores (AMIT Y STERN, 1971; HASHIMOTO Y OTROS, 1989; HEAP Y OTROS, 1995; ZIMATKIN Y LINDROS, 1996) se ha planteado que el sistema catecolaminérgico cerebral podría estar implicado en la mediación de los efectos del AcH en el cerebro. Así, en las neuronas aminérgicas podría haber una capacidad insuficiente para eliminar AcH si lo comparamos con su producción vía catalasa lo que podría llevar a una acumulación local de AcH tras la administración de alcohol. De este modo, la localización de la catalasa en neuronas aminérgicas, pobres en ALDH, puede llevar a una oxidación selectiva del etanol y a una acumulación del AcH en neuronas aminérgicas, activación de estas neuronas y consecuente estimulación del consumo de alcohol.

Esto podría explicar el papel de la catalasa cerebral y del AcH originando acciones psicofarmacológicas centrales del etanol y también indicaría el mecanismo posible de la implicación del sistema de neuronas aminérgicas cerebrales en los efectos centrales del alcohol.

Todos los datos presentados hasta este momento podrían indicar que aunque al igual que ADH y MEOS, la catalasa presenta una serie de dificultades en la mediación del metabolismo central del etanol es también el más firme candidato al mismo. En función de esto a continuación se expone el proceso de cómo la catalasa actuaría en la mediación de la oxidación del etanol a nivel cerebral.

### **2.3.2.- Catalasa y metabolismo del etanol.**

Como se ha visto, aunque hay numerosos estudios que confirman la presencia en el cerebro de todos los sistemas que oxidan alcohol la pregunta de la oportunidad para una oxidación significativa del etanol en el SNC sigue abierta y es tema de debate en la actualidad (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997; ECKARDT Y OTROS, 1998).

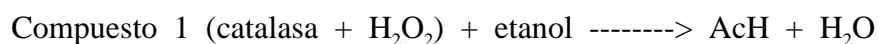
Gaunt y De Duve (1976) pusieron de manifiesto la existencia de catalasa en el cerebro, este enzima se encuentra en los peroxisomas del citoplasma neuronal (BRANNAN Y OTROS, 1980), donde se metabolizan sustancias resultado de lo cual se produce peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es el producto activador de los enzimas antioxidantes –catalasa, glutatión, superóxido dismutasa– que destruyen los radicales libres.

La catalasa posee funciones diferentes, peroxidática o catalítica, dependiendo de la

concentración de peróxido que exista en el organismo (DEMASTER Y OTROS, 1988). La oxidación de, por ejemplo, algunos alcoholes como el etanol o el metanol se da a bajas concentraciones de peróxido.

Como se ha visto, el mecanismo de reacción entre el etanol y la catalasa podría ser el siguiente:

La catalasa reaccionaría con una molécula de peróxido de hidrógeno y se formaría una molécula de catalasa activada que se ha llamado compuesto 1. El compuesto 1 podría reaccionar con el etanol y el resultado de esta reacción sería AcH y agua.



La posibilidad de que esta reacción entre el compuesto 1 y el etanol ocurra en el cerebro está apoyada por varios trabajos.

Por una parte, algunos experimentos (ARAGÓN Y OTROS, 1986; 1991a, b, c) realizados con inhibidores de la catalasa dependientes del peróxido de hidrógeno, como AT, cianamida o 4-hidroxipirazol, ponen de manifiesto que, tanto *in vitro* como *in vivo*, la administración previa de etanol previene a la catalasa de la acción inhibitoria de estas sustancias. Esto sugiere una competición entre el etanol y los inhibidores anteriores por el compuesto 1. Por otro lado, la generación y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto *in vivo* como *in vitro*, en el cerebro de la rata también ha sido confirmada (ARAGÓN Y OTROS, 1991c). Así, la catalasa y el peróxido de hidrógeno reaccionan para formar el compuesto 1. Cuando este compuesto 1 reacciona con el AT, la cianamida o el 4-hidroxipirazol, estos inhibidores destruyen irreversiblemente la actividad de la catalasa cerebral.

Estos resultados sugieren que cuando el etanol esté presente en el organismo competirá con estos inhibidores por el compuesto 1 (catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La consecuencia de esto es que la protección de la inhibición de la actividad de la catalasa por el etanol es una prueba indirecta de que el etanol puede estar compitiendo con el inhibidor por el lugar activo del compuesto 1, siendo estos fenómenos dependientes tanto de la dosis de etanol como de la dosis de inhibidor utilizadas. En este sentido, el etanol podría ser utilizado como un substrato de la catalasa cerebral tanto *in vivo* como *in vitro*.

Así, la primera evidencia para la oxidación del etanol a AcH en el cerebro por la catalasa cerebral fue presentada por Cohen y otros, (1980), que demostraron que el etanol podría prevenir la inhibición de la catalasa cerebral por el AT *in vivo*. Por otra parte, Tampier y Mardones (1979) en un estudio realizado para determinar la función de la catalasa en la oxidación del etanol en homogenados cerebrales de rata, obtuvieron que la adición al medio de AT reducía la oxidación del etanol alrededor de un 50% respecto a los controles.

Estudios posteriores (ARAGÓN Y OTROS, 1991c; GILL Y OTROS, 1992) han confirmado estos resultados sobre la oxidación del etanol y la formación del AcH en cerebros de ratas. En este sentido, se plantea un papel central para la catalasa en la mediación de la oxidación del etanol en el cerebro ya que no se encontró evidencia de la participación de la ADH o del CYP450. De hecho, la metirapona, un inhibidor del CYP450, o el pirazol, un inhibidor de la ADH, no influyeron en la formación de AcH desde el etanol en homogenados de rata. Sin embargo, la presencia en el medio de incubación de AT, cianamida o azida sódica, sustancias todas inhibitoras de la catalasa, disminuían la formación del AcH en función de la dosis utilizada. La formación de AcH se incrementó cuando se añadió al medio directamente peróxido de hidrógeno exógeno o en su defecto un sistema generador de peróxido (ARAGÓN Y OTROS, 1992a).

También, los datos obtenidos con homogenados cerebrales de ratones normales (C3HN) y acatalasémicos (C3HA) –estos ratones tienen una acatalasemia autosómicamente heredada que genera la pérdida de catalasa en el hígado, la sangre y el cerebro (EIDE Y SYVERSEN, 1982)–, incubados con etanol (5-200mM), muestran la existencia de diferencias significativas en la cantidad de AcH generado entre las dos cepas (ARAGÓN Y AMIT, 1993). Los ratones acatalasémicos presentaron una producción de AcH del 4% respecto a la observada en los cerebros de ratones normales, y no del 50% como podría haberse esperado teniendo en cuenta que los ratones acatalasémicos tienen un 50% menos de actividad de catalasa que los ratones normales.

Además, un estudio reciente (REDDY Y OTROS, 1995) con cultivos de neuronas hipotalámicas tratadas con etanol, propanol y butanol, pone de manifiesto que solo el etanol implica una estimulación en la liberación de  $\beta$ -endorfinas. El pretratamiento de estas neuronas con AT generó una inhibición de la liberación de  $\beta$ -endorfinas al mismo tiempo que produjo



una inhibición en la producción del AcH producido por el etanol, ambos tipos de inhibición fueron dependientes de la dosis de AcH utilizada. Por otra parte, se han obtenido los mismos resultados con otro inhibidor de la catalasa, la azida sódica. Estos autores sugieren que la producción de AcH mediada por la catalasa fue responsable del aumento en la liberación de  $\beta$ -endorfinas por la estimulación de etanol (REDDY Y OTROS, 1995). Estos resultados y otros relacionados apoyan el papel de la catalasa en la regulación del metabolismo del AcH en el cerebro, con los efectos subsiguientes en la ingesta de etanol (AMIT Y ARAGÓN, 1988). Así, los efectos mediados por el AcH podrían incrementar con la concentración de AcH.

Zimatkin y otros (1998) también presentan datos que sugieren el papel mediador de la catalasa cerebral en el metabolismo del etanol. Así, plantean que la acumulación de AcH cerebral en diferentes estructuras cerebrales tras ser incubadas con etanol se elimina parcialmente por la administración previa de AT.

Recientemente, otros autores han mostrado (LALLEMAND Y OTROS, 1999) que en cerebros de ratas pretratadas crónicamente con AT la actividad de la catalasa encefálica fue 100 y 10.000 veces disminuida tras la administración de AT a las dosis 0.5 y 1 g/Kg respectivamente. Aunque las concentraciones de etanol en sangre no se modificaron, sí se encontró que la mayor concentración de etanol en el cerebro se obtuvo tras el tratamiento con la mayor dosis de AT (1 g/Kg).

Además, cabría señalar que las concentraciones de etanol utilizadas en los estudios anteriores fueron las mismas que se pueden alcanzar en el cerebro de rata tras ingesta de etanol y que son suficientes para producir efectos farmacológicos (GILL Y OTROS, 1986).

Los datos obtenidos parecen apoyar la idea de la mediación de la catalasa en la oxidación central del etanol, en este sentido los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (COHEN Y OTROS, 1983; ARAGÓN Y OTROS, 1991a, c; 1992a) ponen de manifiesto una interacción entre la catalasa cerebral y el etanol, lo cual apoyaría la idea de una oxidación central del etanol vía la catalasa.

Estos estudios (ARAGÓN Y OTROS, 1991c; 1992a; GILL Y OTROS, 1992) confirman también que los niveles endógenos de peróxido de hidrógeno son el factor que limita el rango para la oxidación del etanol por la catalasa en el cerebro. Y aunque esto pudiera suponer un problema, hay, sin embargo, numerosos candidatos a actuar como fuente de peróxido de hidrógeno.

Así, la superóxido, cuando actúa sobre la superóxido dismutasa, produce peróxido de hidrógeno. Se ha confirmado que el cerebro tiene superóxido dismutasa en abundancia (PARDO Y OTROS, 1985) y la formación de superóxido tiene numerosas posibilidades tales como la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el sistema del citocromo P-450, el metabolismo de las prostaglandinas, la oxidación de la hemoglobina y las catecolaminas (CROSS Y JONES, 1991).

Por otra parte, la MAO genera también peróxido de hidrógeno en el proceso de deaminación oxidativa de las aminas biogénicas (SIMONSON Y OTROS, 1993).

Además, también se ha obtenido que el ácido ascórbico, que está en altas concentraciones en el cerebro, es capaz de incrementar la producción de peróxido de hidrógeno (PRAT Y TURRENS, 1990).

En función de la evidencia de la formación del AcH en el cerebro, la pregunta que todavía quedaría por resolver es si este AcH central tendrá o no consecuencias conductuales.

Varios estudios han planteado una función para la catalasa en diferentes efectos producidos por el etanol. En este sentido, se han obtenido correlaciones positivas entre la actividad total de la catalasa cerebral y el consumo voluntario de etanol en roedores (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; AMIT Y ARAGÓN, 1988; KOEHLING Y AMIT, 1994).

Si la actividad de la catalasa tiene un papel en los efectos conductuales del etanol, la afinidad diferencial de muchas cepas de ratas y ratones podría estar mediada también por la actividad de la catalasa.

Esto es lo que se ha observado a partir de los datos obtenidos en un estudio de la actividad de la catalasa en los ratones C57BL/6J, que presentan un consumo de etanol alto y los DBA/2J que tienen un consumo bajo de etanol y que pertenecen a uno de los modelos genéticos más utilizados en la investigación sobre el alcohol (BROWMAN Y CRABBE, 1998). Entre estas dos cepas además de la diferencia en la preferencia mostrada por el etanol, se han obtenido también diferencias en la actividad de la catalasa; de forma que los que presentan mayor preferencia por etanol tienen menores niveles de catalasa, 35% menos que los DBA/2J; y en la sensibilidad a los efectos del etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1987). Así, dado que los

C57BL/6J oxidan etanol y AcH de forma más rápida que los DBA/2J, tras la ingesta de etanol los niveles de AcH en sangre son mayores para los DBA/2J.

También se evaluó el patrón de consumo voluntario en dos subespecies de ratones una de las cuales era genéticamente acatalasémica. Estas subcepas se consideran idénticas excepto en que una, la CH3-A, tiene una deficiencia mutante en la actividad de la catalasa mientras que la otra, CH3-N, es normal. Se comparó la ingesta de etanol de ambos tipos de cepas y se obtuvo que aunque los ratones acatalasémicos beben alcohol el patrón de consumo que presentan es diferente al que muestran los ratones normales, sobre todo en un paradigma de libre elección entre soluciones de etanol a altas concentraciones (15-24%) y agua. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en el consumo de etanol para concentraciones bajas de alcohol, menores del 10% (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

Estos datos apoyan la idea de que la catalasa cerebral, seguramente a través del metabolismo central de etanol a AcH, tiene un papel en la regulación del consumo voluntario de etanol.

Además, se ha obtenido también una correlación dentro de cada una de estas cepas entre actividad de la catalasa y el consumo de etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1987).

Por otra parte, se ha demostrado que ratas preferentes al etanol, ratas P, tienen mayor actividad de la catalasa que las que presentan una preferencia o un consumo bajo, ratas no P (GILL Y OTROS, 1996).

La manipulación de la catalasa mediante inhibidores de su actividad ha sido otra de las estrategias utilizadas para determinar su posible mediación en el metabolismo del etanol.

Así, se ha obtenido que en animales pretratados con AT, no solo se observó una disminución de la ingesta y la preferencia por el etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1992), sino que también se obtuvo una disminución en el tiempo de narcosis y en la mortalidad inducida por etanol (TAMPIER Y OTROS, 1979; 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991b). Estos resultados se han obtenido también en ratones (KOECHLING Y AMIT, 1994).

Por otra parte, también se ha observado una disminución de la depresión locomotora en ratas. En este sentido, se ha visto que la actividad locomotora medida en un campo abierto de ratas pretratadas con AT y cuatro horas después tratadas con etanol (2 g/Kg) o salina fue

significativamente atenuada por el pretratamiento con AT. Sin embargo, la actividad motora de los animales control y de los tratados con una dosis menor (1 g/kg) de etanol no se vio afectada por el AT. La actividad total de la catalasa cerebral en los animales pretratados con AT fue un 15% de la de los animales pertenecientes al grupo control o lo que es lo mismo se obtuvo una reducción del 85% de la actividad de la catalasa respecto al grupo control. En este estudio, el bloqueo de la depresión motora producida por el AT no puede ser atribuido a alteraciones los niveles de etanol disponibles para la acción central, ya que no se obtuvieron diferencias en los niveles de etanol en sangre para los animales pretratados con AT o salina (ARAGÓN Y OTROS, 1989).

Este mismo resultado, ya había sido obtenido anteriormente por otros autores (ARAGÓN Y OTROS, 1985a) que no encontraron diferencias en los niveles de etanol (1,2 g/kg) en sangre medidos 15 minutos después del intervalo de 4 horas desde el pretratamiento con AT. También se ha obtenido que la inhibición de la catalasa por el AT bloquea conductas inducidas por la exposición al etanol como el CAS inducido por etanol. Así, se ha puesto de manifiesto que el etanol puede generar un CAS a una solución de sacarina emparejada con la administración de la droga. Si el etanol era administrado a animales pretratados con AT, estos no mostraban CAS a la administración de etanol. En función de estos resultados, se podría afirmar que el pretratamiento con AT bloqueó el CAS inducido por etanol.

Este efecto del AT parece ser específico para el etanol ya que el CAS producido por otras drogas, como morfina y cloruro de litio, no se ve afectado por el pretratamiento con este inhibidor, además, niveles periféricos de etanol y AcH en sangre fueron los mismos para todos los animales, poniendo de manifiesto que el AT no afecta los niveles periféricos de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1985a).

Además, también se ha demostrado que la inhibición de este enzima por AT bloquea la actividad locomotora inducida por la exposición al etanol en ratones (ARAGÓN Y OTROS, 1989). En relación con esta conducta (ESCARABAJAL Y OTROS, 1999) han realizado un estudio sistemático del efecto de este inhibidor sobre los efectos que el etanol tiene sobre la actividad locomotora, en este estudio se contempla un amplio rango de dosis de AT al tiempo que integra una evaluación de los intervalos de tiempo óptimos entre el pretratamiento con AT y el tratamiento con etanol para que el inhibidor ejerza su máximo efecto sobre la actividad de la catalasa. Los resultados obtenidos van en la línea comentada anteriormente encontrando una

inhibición por parte del AT de la actividad locomotora inducida por etanol que es máxima a las cinco horas de la inyección del inhibidor al tiempo que depende de la dosis de AT utilizada.

Por otra parte, los estudios con actividad locomotora muestran que los ratones normales tienen mayor actividad locomotora que los acatalasémicos (ARAGÓN Y OTROS, 1992b) tras el tratamiento con etanol, sin embargo, no se observaron diferencias en la actividad locomotora espontánea entre ambas cepas de ratones. Además, cuando la cepa de ratones normales fue tratada con AT se observó una disminución de la actividad locomotora similar a la mostrada por los ratones acatalasémicos sin ese tratamiento previo (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que el tratamiento con un inhibidor de la catalasa altera algunos de los efectos conductuales del etanol, efectos que podrían estar causados por una reducción en la formación del AcH central.

### **2.3.3.- Estudios con poblaciones humanas.**

Como se ha presentado anteriormente, la hipótesis de la mediación central de la catalasa en el metabolismo central del etanol ha sido evaluada en animales pero no se tenían datos en ese sentido con humanos. Sin embargo, estos se obtuvieron a partir de los resultados de Amit y Aragón (1988) que indicaban una correlación positiva entre actividad de la catalasa cerebral y la eritrocitaria antes, durante y después de la exposición al etanol. Sobre la base de estos datos se inició la investigación en humanos. Esta investigación con sujetos humanos, en los que se medían los niveles de actividad de la catalasa en eritrocitos, proporcionaban un procedimiento muy simple y nada invasivo para medir actividad de la catalasa.

En este sentido, la relación entre actividad de la catalasa sanguínea y el consumo de alcohol fue examinada en un grupo de sujetos voluntarios (KOECHLING Y AMIT, 1992), los resultados obtenidos en este estudio indicaron una correlación positiva entre consumo de alcohol, calculado como el consumo típico durante un periodo de 30 días, y actividad de la catalasa ( $r = 0.65$   $p < 0.001$ ). Mediante un análisis de regresión múltiple se determinó que la catalasa era la variable predictora con mayor significación. Estos datos proporcionan la primera evidencia derivada de la población humana que apoyan la idea de que la actividad de la catalasa puede tener una significación positiva en la determinación del uso típico de alcohol en humanos.

Estos resultados son también consistentes con la asunción teórica básica subyacente a la presente investigación que plantea que el AcH central producido a través de la actividad metabólica de la catalasa puede desempeñar un papel en la regulación del consumo de alcohol, así como en una amplia variedad de otras conductas relacionadas con el alcohol (SMITH Y OTROS, 1990).

Además, también las observaciones anteriores realizadas con animales (AMIT Y ARAGÓN, 1988) indican que esta relación no puede ser el resultado de una inducción del enzima a través de la ingestión de etanol.

En un estudio posterior, veinte voluntarios tomaron 0.5 g/kg de alcohol o una solución control (KOECHLING Y OTROS, 1995) y no se observaron diferencias en la actividad de la catalasa en sangre entre los sujetos que tomaron etanol y aquellos que tomaron la solución control en diferentes momentos de la ingesta. Estos datos son coherentes con los obtenidos en animales sobre que el etanol no induce al enzima (AMIT Y ARAGÓN, 1988). A partir de este fallo del etanol para inducir la actividad de la catalasa por parte de algunos autores se apoyó la idea de que la actividad de la catalasa puede ser un marcador viable de la propensión a consumir etanol entre los humanos (AMIT Y ARAGÓN, 1988).

En los estudios realizados (KOECHLING Y OTROS, 1995) sobre la relación entre actividad de la catalasa y consumo voluntario de etanol en sujetos pertenecientes a familias con historia de alcoholismo (FH<sup>+</sup>) y sujetos sin historia familiar de alcoholismo (FH<sup>-</sup>), se obtiene que los sujetos FH<sup>+</sup> tienen una media mayor en la actividad de la catalasa comparados con los sujetos con FH<sup>-</sup>. Ambos grupos mostraron correlación entre actividad de la catalasa e ingesta de etanol, sin embargo, los FH<sup>+</sup> presentaban una correlación mayor ( $r = 0.47$ ) y se explicaba el 22% de la varianza frente a una correlación de 0.22 y una varianza explicada del 7% para los FH<sup>-</sup>. Además, el análisis de los datos correlacionales indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambas correlaciones. Por su parte, los datos obtenidos mediante la prueba de regresión múltiple indicaron que la actividad de la catalasa de sujetos FH<sup>+</sup> tenía una contribución mayor a la varianza de la ingesta de etanol, indicando que la actividad de la catalasa en eritrocitos humanos correlacionó con autoinformes de patrones típicos de ingesta de alcohol.

Así, los sujetos con una historia positiva de alcoholismo se diferenciaban de los que no la tenían en los niveles de ingesta y en la actividad de la catalasa, y en el mismo sentido que en los datos de animales, la actividad de la catalasa parece ser la que determina el consumo de etanol y no a la inversa.

En este sentido, los resultados obtenidos en los estudios con sujetos humanos son congruentes con los datos procedentes de los experimentos con animales y dan un fuerte apoyo a la idea de que la actividad de la catalasa en humanos y especialmente en los que tienen una historia familiar de alcoholismo, puede representar un marcador biológico de la propensión de los individuos, llamados de alto riesgo, a consumir etanol.

Hasta ahora se han presentado datos de la implicación del AcH en la mediación de algunos de los efectos del etanol, mostrando que el AcH se forma en el cerebro a través de la acción de la catalasa en presencia de etanol y de  $H_2O_2$ . Al mismo tiempo, varios estudios han indicado la importancia biológica y conductual del AcH. Además, también se ha visto que la actividad central peroxidativa de la catalasa está positivamente correlacionada con la mayor parte de las acciones conductuales conocidas del etanol plasmándose esta relación tanto en estudios con animales como con humanos.

Por otra parte, los datos obtenidos a partir del uso de inhibidores de la actividad de la catalasa dió lugar a una atenuación o bloqueo del consumo voluntario de etanol, así como de otras conductas inducidas por etanol.

En función de todo esto, la explicación más parsimoniosa es la de un mecanismo putativo neurobiológico y conductual por el cual la catalasa podría ejercer su efecto sobre las acciones conductuales del etanol vía el proceso dependiente del  $H_2O_2$  que produce cantidades suficientes de AcH capaces de afectar los de transmisores monoaminos centrales implicados en los procesos motivacionales primarios.

En el punto siguiente se presentarán datos que también apoyan la idea de la mediación del AcH en algunos de los efectos producidos por el etanol mediante la acción de la ALDH cerebral en la oxidación del AcH.

### **2.3.4.- La presencia de AcH en el cerebro.**

#### **2.3.4.1.- Generalidades.**

Los resultados obtenidos en estos estudios apoyan la idea de que los efectos del AcH central pueden tener un importante papel en la mediación de las acciones del etanol. Sin embargo, ha habido dificultades relacionadas con el intento de detectar AcH en el cerebro (ERIKSSON, 1980). El AcH parece ser solo detectable en el cerebro cuando se da una intoxicación importante de etanol o tras la administración de inhibidores del metabolismo del AcH, como disulfirán o cianamida (WESTCOTT Y OTROS, 1980). Sin embargo, la escasez de resultados concluyentes de la presencia de AcH en el cerebro, no elimina totalmente la posibilidad de que este exista. Esto puede ser particularmente relevante ya que las cantidades necesarias para producir efectos farmacológicos siguen sin haberse determinado.

Sin embargo, no está claro si el AcH encontrado en el cerebro después de la administración de etanol es producido localmente o es más bien transportado desde el hígado, a pesar del hecho de que el AcH no cruza fácilmente la BHE debido a la presencia de ALDH en la microvasculatura del cerebro (ZIMATKIN Y LINDROS, 1996). En realidad, aunque los diferentes enzimas implicados en el metabolismo han sido identificados a nivel cerebral, su habilidad para metabolizar etanol está generalmente considerada menor o más débil en el cerebro.

Un reciente estudio (EYSSERIC Y OTROS, 1997) ha intentado demostrar la habilidad de los cultivos de astrocitos para producir AcH desde el etanol. Estos autores expusieron los cultivos a concentraciones de etanol que se consideran dentro del rango de los valores observados clínicamente. Los resultados de este estudio indican que se produce un metabolismo significativo del etanol en los cultivos y, aunque la producción es menor que la observada en los hepatocitos, se encuentran en el mismo rango que las que se miden en los homogenados cerebrales en conjunto y se corresponden con niveles biológicamente activos de AcH (ARAGÓN Y OTROS, 1992a; GILL Y OTROS, 1992). Este estudio ha sido realizado con astrocitos ya que se ha visto que el AcH es capaz de afectar su desarrollo normal (HOLOWNIA Y OTROS, 1996) y porque la integridad de estos es crucial para un desarrollo y un funcionamiento normal de las neuronas (KIMELBERG Y NORENBURG, 1989).

Los datos obtenidos en estudios anteriores (ARAGÓN Y OTROS, 1992a) ya generaron datos en esta línea. Así, se ha visto que se produce oxidación de etanol en homogenados cerebrales perfundidos de ratas que fueron previamente incubados con etanol. En este estudio se obtuvo



que las únicas sustancias que indujeron una reducción del AcH generado fueron el AT y la cianamida, frente a la utilización de metirapona, un inhibidor del citocromo P-450, o de pirazol, un inhibidor de la ADH.

Estos resultados apoyan la idea de una oxidación central del etanol en homogenados cerebrales de rata. Al mismo tiempo se apoya también el planteamiento de que el AcH se produce directamente en el cerebro y que puede ser el agente mediador de algunas de las propiedades farmacológicas del etanol.

Estudios más recientes (HAMBY-MASON Y OTROS, 1997) aportan datos que confirman que el AcH está presente en el cerebro adulto (WESTCOTT Y OTROS, 1980) y en el cerebro fetal (CLARKE Y OTROS, 1986) después de la ingesta de etanol.

En este sentido, la utilización de homogenados de cerebro de ratas inmaduras ha puesto también de manifiesto la posibilidad de una generación de AcH vía una reacción mediada por la catalasa, planteando además que el AcH puede ser producido *in vivo* en ese sistema (HAMBY-MASON Y OTROS, 1997). Cuando los homogenados fueron incubados con inhibidores de la catalasa –como el AT o la azida sódica–, se obtuvo un bloqueo en la formación de AcH, mientras que inhibidores de la ADH o del P-450, no disminuyeron la producción de AcH, a partir de lo cual, se podría decir que ni la vía oxidativa del CYP 2E1 ni la de la ADH son fuentes de AcH medible en el cerebro.

Así, se podría afirmar que, en congruencia con estudios anteriores (GILL Y OTROS, 1992) que informaron de que los homogenados de cerebros neonatales generan AcH, el AcH es producido probablemente en el cerebro de la rata fetal y neonatal a partir de la oxidación del etanol mediada por la catalasa.

Otros estudios han implicado la acción del AcH en la secreción de  $\beta$ -endorfinas en neuronas hipotalámicas (REDDY Y SARKAR, 1993; REDDY Y OTROS, 1995). La exposición de estas células neuronales a diferentes concentraciones de etanol y AcH causó un incremento dependiente de la concentración en la secreción de  $\beta$ -endorfinas. Estos resultados muestran por primera vez que el metabolito del etanol, el AcH, es más potente en la estimulación de la secreción de  $\beta$ -endorfinas que el etanol y puede tener una función significativa en la secreción de  $\beta$ -endorfinas reguladas por etanol. Así, los resultados sugieren la posibilidad de que los efectos del etanol sobre las neuronas de  $\beta$ -endorfinas estén, en parte, mediados por el AcH.

Un estudio posterior (REDDY Y OTROS, 1995) realizado en un intento de determinar si la acción del etanol sobre las  $\beta$ -endorfinas es secundaria a su conversión a AcH, se pretrató los homogenados con AT, un inhibidor de la catalasa. Los resultados indican que el aumento en la inhibición ejercida por el AT de la secreción de  $\beta$ -endorfinas inducida por etanol parece estar relacionada con su bloqueo de la conversión de etanol a AcH. Los mismos resultados se obtuvieron tras el pretratamiento con azida sódica. A partir de estos resultados, se podría afirmar que el AcH mediaría parte del efecto estimulador del etanol sobre la secreción de  $\beta$ -endorfinas.

Como se ha visto, aunque existe un eficiente sistema de oxidación de AcH en la BHE que mantiene la entrada de AcH periférico dentro del cerebro en un nivel mínimo (ERICKSSON Y SIPPEL, 1977); existe también una clara evidencia de que el tejido cerebral metaboliza etanol a AcH (ARAGÓN Y OTROS, 1992a; GILL Y OTROS, 1992).

#### **2.3.4.2.- Pruebas genéticas.**

Los datos obtenidos con diferentes cepas de ratas y ratones también indican la presencia de AcH en el cerebro tanto desde estudios *in vitro* como mediante las diferencias conductuales observadas en los animales. Así, se ha observado que las ratas pertenecientes a la cepa UChB muestran una capacidad de oxidación de AcH menor que la de las ratas UChA (TAMPIER Y OTROS, 1984), obteniéndose la mayor cantidad de AcH en el córtex diencefálico de estas últimas (TAMPIER Y OTROS, 1980). Un estudio *in vitro* realizado con homogenados cerebrales de animales de ambos sexos pertenecientes a las dos cepas mostró que las UChB tienen mayor capacidad de oxidación por una afinidad mayor en su ALDH por el NAD (QUINTANILLA Y TAMPIER, 1995).

Otros estudios con cepas de alto y bajo consumo voluntario de alcohol (*Alko alcohol* –AA– y *Alko nonalcohol* –ANA– respectivamente) muestran diferencias entre estas ratas en la oxidación del etanol. Así, en las hembras de ratas AA se observó un rango mayor en la

oxidación del etanol que en las ANA, al mismo tiempo se demostró que las ratas pertenecientes a la cepa AA presentó menores niveles de AcH que las ANA durante la oxidación de etanol (ERIKSSON, 1973).

Por su parte, los datos con sujetos humanos indican que el AcH se encuentra en mayores concentraciones en alcohólicos y bebedores severos después de la ingestión de etanol comparados con bebedores sociales o abstemios (ZEINER Y OTROS, 1983).

Después de esta breve revisión sobre los datos que indican la existencia de AcH en el cerebro, no deberíamos obviar que, como señala Hunt (1996), aunque el papel del AcH en las acciones del etanol es prometedor su apoyo es indirecto y circunstancial implicando estudios correlacionales y evidencia farmacológica.

Por último, un papel significativo del AcH en las acciones del etanol en el cerebro requiere la presencia de AcH en el cerebro después del consumo de etanol en cantidades consistentes con las que se utilizan en los experimentos que muestran cambios biológicos o conductuales. Por el momento, los datos no son convincentes. Lo que se requiere es una vía en la que el AcH pueda ser cuantificado en el cerebro *in vivo* después de la administración de etanol.

En el punto siguiente se presentarán datos que también apoyan la idea de la mediación del AcH en algunos de los efectos producidos por el etanol mediante la acción de la ALDH cerebral en la oxidación del AcH.

Hasta este momento los datos presentados ponen de manifiesto que cuando tras la administración de etanol el AcH se encuentra en la periferia a altas concentraciones, puede inducir reacciones aversivas tanto en humanos como en animales (LINDROS, 1984). Por otra parte, se ha mostrado también que el AcH está relacionado con conductas como, por ejemplo, la autoadministración intraventricular (i.v.) de esa misma sustancia (BROWN Y OTROS, 1979; 1980) que lo relacionan con propiedades reforzantes positivas. Sin embargo, aunque parece que el AcH puede actuar como un agente positivo o aversivo por sí mismo, no existe acuerdo en su función mediadora de algunos de los efectos del etanol.

Como se ha visto en los apartados anteriores, esto ha llevado a realizar numerosas investigaciones orientadas a demostrar la presencia de AcH en el cerebro tras la exposición al etanol.

Por otra parte, los datos presentados hasta este momento sobre el metabolismo central del etanol requieren el tratamiento de los enzimas cerebrales implicados no solo en la producción central de AcH sino también de los enzimas responsables de la eliminación de esta sustancia. Por ello en el siguiente apartado se presentan los datos conocidos sobre la ALDH cerebral, su localización, funciones y su posible implicación en la mediación de algunas de las acciones relacionadas con el etanol y más directamente con el AcH.

## **2.4.- Aldehído deshidrogenasa (ALDH).**

### **2.4.1.- Localización cerebral.**

Se sabe de la presencia de ALDH en el cerebro de diferentes especies de mamíferos como el ser humano (INOUE Y LINDROS, 1982) y la rata (KOIVULA Y OTROS, 1981) entre otros. Los estudios realizados para determinar su localización cerebral han puesto de manifiesto que se halla ampliamente distribuida por todo el cerebro (ZIMATKIN Y OTROS, 1992; ZIMATKIN Y LINDROS, 1996); en este sentido, las neuronas de ALDH se reparten en el cerebro de la siguiente forma, un 40% se localizan en el núcleo arqueado hipotalámico y un 88% en las células cerebrales de Purkinje (ZIMATKIN Y OTROS, 1992).

Los trabajos que informan de la actividad del enzima, revelan que la fracción mitocondrial es en la que se observa la mayor actividad del enzima. Así, las neuronas de la ALDH mitocondrial se pueden encontrar en todas las regiones cerebrales, localizándose desde las estructuras donde es más abundante –oliva inferior–, hasta estructuras donde se encuentra en menor cantidad como el estrato piramidal del hipocampo y la sustancia negra (ZIMATKIN Y OTROS, 1992).

En este sentido, un estudio realizado en diferentes regiones del cerebro de rata indican que la actividad de la ALDH fue la misma en córtex, subcórtex, médula y cerebelo pero presentando una actividad del enzima ALDH en las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólica con diferencias en la distribución de esta actividad, así el porcentaje de actividad fue del 40, 28 y 12% respectivamente (WEINER Y ARDELT, 1984).

Estos datos son congruentes con los obtenidos en un estudio (INOUE Y LINDROS, 1982) realizado a partir de autopsias de cerebros humanos en el que utilizando AcH como sustrato, se obtuvo que alrededor de la mitad de la actividad total de la ALDH se encontró en la fracción mitocondrial, que contiene tanto a la mitocondria como a los sinaptosomas, y una menor actividad en las fracciones citosólica (10-15%), nuclear y microsomal (10%). La distribución de la actividad fue bastante similar para las dos concentraciones de AcH utilizadas (0.12 y 6 mM) aunque se obtuvo alrededor de cuatro veces más actividad para la mayor concentración de sustrato.

Por otra parte, algunos datos conductuales apoyan esta idea ya que cuando se comparó la ingesta voluntaria de etanol con las formas subcelulares, las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólica, de ALDH cerebral en ratas Long Evans se obtuvieron correlaciones altas por una parte entre la ALDH cerebral mitocondrial y la ingesta de etanol y por otra, entre la fracción microsomal de la ALDH cerebral y la mencionada ingesta de alcohol (SOCARANSKY Y OTROS, 1985).

Además, se han observado diferentes isozimas de ALDH con capacidad para oxidar tanto aldehídos alifáticos como aldehídos aromáticos (KOIVULA Y OTROS, 1981; INOUE Y LINDROS, 1982).

Todos estos datos tomados en conjunto sugieren la presencia de diferentes isozimas de ALDH en el cerebro humano (INOUE Y LINDROS, 1982). Por otra parte, se ha visto que la distribución subcelular en el cerebro humano parece ser bastante similar a la del hígado humano, que también contiene varios isozimas (KOIVULA, 1975).

Así, aunque la actividad de la ALDH en el tejido cerebral es sólo un pequeño porcentaje de la que se ha encontrado en el hígado, los resultados obtenidos por Inoue y Lindros (1982) demuestran que el cerebro humano tiene una amplia capacidad para oxidar tanto los aldehídos biogénicos formados endógenamente como los aldehídos exógenos, como por ejemplo el AcH formado durante la oxidación del etanol.

Estudios posteriores (ZIMATKIN, 1991; ZIMATKIN Y OTROS, 1992) han informado de una distribución más exacta de la ALDH en el cerebro de forma que se puede encontrar, en el cerebro de rata, una actividad moderada de la ALDH en los capilares y alrededor de los

astrocitos y una actividad alta en los endotelios que recubren las cavidades cerebrales y los del plexo vascular.

También se han llevado a cabo varios estudios (ZIMATKIN Y LINDROS, 1989; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1995) en los que se determinó la localización y la actividad de la ALDH en diferentes cepas de ratas y ratones. En este sentido, se ha detectado la actividad de la ALDH mediante histoquímica en varias estructuras cerebrales (ZIMATKIN Y LINDROS, 1989). Todas las cepas evaluadas –AA y ANA diferentes en la ingesta de etanol, así como las cepas diferentes en incoordinación motora inducida por etanol, unas que muestran incoordinación motora inducida por etanol –AT–, y otras que no la presentan –ANT– exhibieron la mayor actividad de la ALDH en neuronas del tracto mesencefálico del núcleo del nervio trigémino y en las motoneuronas de la médula espinal. Mientras que las actividades menores se detectaron en el córtex somatosensorial.

Por otra parte, se compararon los niveles de actividad de la ALDH en los cerebros de cepas de ratas y ratones mediante métodos histoquímicos. Se evaluaron ratones que presentan ante el etanol sueño breve o corto (SS) y los que lo tienen prolongado o largo (LS) así como, a ratas que tienen una elevada sensibilidad al alcohol (*high alcohol sensitive*, HAS) y las que la tienen más baja (*low alcohol sensitive*, LAS). Encontrando que aunque la actividad de la ALDH es detectada en la mayor parte de las áreas del cerebro, sólo en las células cerebelares de Purkinje se encontró una diferencia entre las líneas de ratas y ratones sensibles y resistentes al alcohol. Las líneas resistentes, SS y LAS, mostraron niveles estadísticamente mayores de ALDH que las líneas sensibles, LS y HAS (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1995).

Por otra parte, y respecto a su relación con la actividad de la catalasa cerebral, es interesante destacar que aunque la actividad de la ALDH, relacionada con la capacidad de oxidar AcH, está ampliamente distribuida en las estructuras cerebrales, su actividad relativa es comparativamente menor en los pericariones de las neuronas aminérgicas, especialmente las catecolaminérgicas, donde sí se da una actividad alta de la catalasa (ZIMATKIN Y LINDROS, 1996), en cerebros de ratas (ZIMATKIN, 1991; ZIMATKIN Y OTROS, 1992) y en los de humanos (MOTAVKIN Y OTROS, 1990).

Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, a pesar de las diferencias en la localización entre la actividad de la catalasa y la de la ALDH no se invalida la posible acción central del AcH.

Además, en un intento de determinar la función de la ALDH en su relación con las conductas inducidas por etanol se han utilizado diferentes estirpes de ratas y ratones. Así, en los apartados siguientes se presentan datos de estudios genéticos y conductuales que indican la relación entre actividad de la ALDH cerebral y varias de las conductas en las que está implicado el etanol y a la vez su metabolito, el AcH.

#### **2.4.2.- Estudios genéticos.**

Aunque es difícil la tarea de determinar si el AcH tiene o no una función en las acciones del etanol en el cerebro, desde la estrategia genética se ha intentado establecer la posible relación entre la actividad de la ALDH y los efectos del etanol sobre algunas conductas como el consumo voluntario de alcohol. Desde esta perspectiva, algunos autores (ZIMATKIN Y LINDROS, 1989) han planteado que varias de las diferencias observadas en la distribución de la mayor o menor actividad de la ALDH en determinadas estructuras de ratas pertenecientes a diferentes cepas (AA, ANA, AT, ANT) pueden relacionar las diferencias entre cepas de ratas con respecto a la ingesta voluntaria de alcohol y con la incoordinación motora inducida por etanol.

Otros estudios (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1995) orientados también a la finalidad de determinar la función de la ALDH cerebral en las acciones del etanol han derivado datos de la relación entre ALDH y algunas de las acciones del etanol utilizando para ello ratas y ratones seleccionados en base a su sensibilidad o resistencia a los efectos hipnóticos iniciales del etanol, por una parte, ratones SS y LS, y por otra, ratas HAS y LAS.

Los resultados indican que en esas líneas de ratas y ratones se da una expresión genética similar respecto a la actividad de la ALDH en el cerebro. Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas en la actividad de la ALDH en las neuronas cerebelares de Purkinje. La capacidad de oxidar aldehído en esas células fue mucho mayor en las ratas LAS que en las HAS.

Estudios previos han apoyado la idea de que la ALDH es importante en las acciones del etanol encontrándose diferencias en la actividad total de la ALDH en algunas estructuras del SNC de ratas que fueron seleccionadas por su baja (alcohol-tolerant, AT) o alta sensibilidad (alcohol-nontolerant, ANT) a la incoordinación motora causada por el etanol (ZIMATKIN Y LINDROS, 1989). Resultados similares han sido encontrados en ratas seleccionadas por las distribuciones temporales extremas de sueño a causa de su sensibilidad al etanol (ZIMATKIN Y LINDROS, 1980). En este sentido, se encontraron cantidades significativamente mayores de actividad de ALDH cuando se utilizó AcH como substrato en los animales con insensibilidad o con menor sensibilidad al etanol. En particular, la capacidad de oxidar AcH fue mayor en las neuronas de la corteza, las neuronas cerebrales de Purkinje y en el núcleo acumbens.

Del mismo modo, otras investigaciones muestran que en ratas pertenecientes a una población heterogénea (*outbred*) (ZIMATKIN Y LINDROS, 1990) se observa también una mayor actividad de las neuronas de Purkinje en la oxidación de aldehído. Con ratas ANT y AT no se observaron diferencias en estas neuronas aunque los valores de actividad fueron mayores en ratas AT.

Estos datos podrían indicar que la relación entre sensibilidad al alcohol y la actividad de la ALDH en las células de Purkinje puede contribuir en algunas cepas de ratas a las diferencias en la sensibilidad al etanol pero en otras no.

En los ratones la única diferencia se encontró en los lóbulos del cerebelo. Y de acuerdo con los resultados obtenidos en ratas, los ratones con baja sensibilidad (SS) también mostraron mayores niveles de actividad en las células de Purkinje (ZIMATKIN Y DEITRICH, 1995).

La hipótesis que se plantea es que la actividad de la ALDH está genéticamente controlada y tiene algún papel en la sensibilidad inicial al etanol en las ratas HAS y LAS, en los ratones LS y SS, y en las ratas *outbred* estudiadas por Zimatkin y Lindros (1990).

En resumen, se podría afirmar que los animales que son más resistentes al etanol tienen un mayor nivel de ALDH en las células cerebelares de Purkinje que los que son sensibles a los efectos del etanol.



Por su parte, Eriksson (1973) informó que los niveles de AcH en sangre durante el metabolismo del etanol son mayores para las ratas que evitan el alcohol, ANA, que para las que lo prefieren, AA. Además, se ha obtenido que las ANA tienen no solo una ADH más eficaz que las AA sino también una ALDH menos eficaz (KOIVULA Y OTROS, 1975; KOIVISTO Y ERIKSSON, 1994). En este sentido y, teniendo en cuenta la analogía existente entre el patrón presente en algunos orientales que poseen la ALDH atípica y el patrón presentado por las ratas ANA, algunos autores (KOIVISTO Y ERIKSSON, 1997) han planteado que se podría asumir que la deficiencia en el metabolismo del AcH podría ser el factor subyacente al bajo consumo de etanol presentado por estas ratas, al mismo tiempo que se plantea que esta cepa podría actuar como un modelo animal para la deficiencia observada en sujetos humanos en la ALDH<sub>2</sub>. Así, en ratas ANA, se ha observado un menor consumo voluntario de etanol y también mayores niveles de AcH que las AA (ERIKSSON, 1973; 1980; KOIVISTO Y ERIKSSON, 1994; KOIVULA Y OTROS, 1975). Sin embargo, no se han detectado diferencias en la ALDH cerebral entre ratas ANA y AA (INOUE Y OTROS, 1975).

Otros autores (INOUE Y OTROS, 1981) no han observado diferencias comparando ratas pertenecientes a estas cepas en función del sexo y la cepa a la que pertenecen pero que no han tenido experiencia previa con el alcohol respecto a la actividad de la ALDH en homogenados cerebrales. En cambio, en ratas con experiencia previa con etanol sí se observó una mayor actividad enzimática en las hembras de la cepa de ratas AA que en los machos de la misma cepa. Sin embargo, si se compara los datos de las cepas de ratas AA y ANA, no se muestra ninguna relación significativa entre la actividad de la ALDH cerebral y la ingesta de etanol.

Por su parte, Sinclair y Lindros (1981) trataron a ratas de la cepa ANA con cianamida para suprimir su ingesta de etanol. Además, algunos de los grupos fueron sometidos a un pretratamiento con 4-MP. Sin embargo, el pretratamiento con 4-MP no supuso un aumento en la ingesta de etanol. Estudios posteriores con estas cepas confirmaron que la actividad de la ALDH, en estas cepas, no estaba relacionada con los diferentes niveles de ingesta de etanol (INOUE Y OTROS, 1981).

Todos estos datos, tomados en conjunto, indican que la alta actividad de la ALDH podría acelerar la eliminación del AcH e incrementar el consumo de etanol reduciendo la respuesta aversiva.

Otros resultados muestran, por ejemplo, que los ratones de la cepa C57BL tienen una mayor actividad de la ALDH hepática y menores niveles de AcH en sangre después de la ingesta de etanol que los ratones que evitan el etanol (DBA/2J). También se ha informado de que la ALDH cerebral correlaciona con el consumo de etanol en ratas Long-Evans (SOCARANSKY Y OTROS, 1985).

Además, también desde los datos obtenidos con ratas de la cepa UCh, se pone de manifiesto que se produce metabolismo de AcH en el cerebro y el enzima implicado en este es la ALDH (QUINTANILLA Y TAMPIER, 1995). Así, se ha obtenido que la capacidad de oxidación de etanol a AcH en homogenados cerebrales es diferente para las UChA y las UChB, presentando las primeras una mayor oxidación del etanol (TAMPIER Y OTROS, 1984). Al mismo tiempo, se obtiene también que la oxidación de AcH es mayor en las ratas pertenecientes a la cepa UChB que en las que pertenecen a la cepa UChA.

En este sentido, los estudios *in vitro* realizados con homogenados cerebrales pertenecientes a ambos sexos de estas dos cepas, UChA y UChB, se obtiene que las ratas UChB tienen mayor capacidad de oxidación debido a que su ALDH mitocondrial de baja Km exhibe una mayor afinidad por el NAD (QUINTANILLA Y TAMPIER, 1995).

Por su parte, los datos de la genética humana indican resultados similares a los presentados sobre la ALDH periférica. Así, se plantea que en sujetos con deficiencia en ALDH mitocondrial de baja Km, se observa una mayor concentración de AcH tras la ingesta de etanol que en sujetos con ALDH normal (MIZOI Y OTROS, 1985). Siendo estos niveles elevados de AcH parcialmente responsables de las bajas dosis de etanol consumidas por estos sujetos (AGARWAL Y OTROS, 1984; TU E ISRAEL, 1995).

En otro estudio con sujetos de origen asio-americano con alelos de ALDH<sub>2\*2</sub> que experimentan *flushing* facial después de consumir etanol, fueron comparados con un grupo control asiático que presentaban el alelo ALDH<sub>2\*1</sub>, que no experimenta *flushing*. Tras la ingesta de alcohol, los primeros informaron haber experimentado sensaciones más positivas de la intoxicación que los segundos. Los sujetos con el alelo ALDH<sub>2\*2</sub> experimentan una respuesta al alcohol más intensa aunque no necesariamente más negativa. Esta reacción de sensibilidad al alcohol que experimentan muchos asiáticos que sufren *flushing* podría contribuir a su baja tendencia a beber excesivamente, incluso aunque su respuesta al alcohol no sea predominantemente negativa (WALL Y OTROS, 1992).

Dada la idea de que el *flushing* inducido por etanol podría servir como protección contra el desarrollo del alcoholismo, se asumió que los sujetos que mostraban *flushing* experimentarían reacciones subjetivas negativas al alcohol. Y aunque hay estudios en ese sentido (WOLFF, 1972), también existen otros (SANDERS Y OTROS, 1980) que han informado que los sujetos con *flushing* experimentaban sensaciones más vigorosas después de beber.

En esta línea se enmarcan también los datos obtenidos en trabajos con animales y humanos (AMIT Y OTROS, 1980), en los que se informa de que bajo determinadas condiciones los inhibidores de la ALDH, como el disulfirán o la cianamida, no generan efectos aversivos en la ingesta de etanol y lo que es más importante, en sujetos humanos estos inhibidores pueden aumentar los efectos euforizantes del alcohol cuando este es consumido en pequeñas cantidades, cantidades de alcohol que, por otra parte, sin ese tratamiento previo, no ejercen ningún efecto en los sujetos.

También en ingesta de alcohol, Amir (1978b) ha propuesto que el incremento en la actividad de la ALDH cerebral tras el consumo de etanol en ratas es debido al AcH derivado del etanol. Además, este autor ha planteado también que el consumo voluntario de etanol correlaciona con la actividad de la ALDH en ratas (AMIR, 1978a, b).

#### **2.4.3.- Estudios conductuales. El uso de inhibidores de la ALDH.**

Como se expuso anteriormente, tras el pretratamiento con inhibidores de la ALDH como el disulfirán y la cianamida se observan o reducciones en la ingesta de etanol o una supresión en el consumo voluntario de esta sustancia, tanto en humanos como en animales de laboratorio (KOE Y TENEN, 1970; REED Y OTROS, 1976; MOTTIN, 1973; AMIT Y OTROS, 1980; ERIKSSON Y DEITRICH, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981). En este sentido, el pretratamiento con calcio cianamida (CC) incrementó la concentración de AcH y disminuyó el consumo de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCLAIR Y OTROS, 1980) así como la actividad locomotora inducida por etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987b). Algunos autores justifican este hecho planteando que los altos niveles de AcH en sangre, como consecuencia de la inhibición de ALDH (DEITRICH Y OTROS, 1976) son tóxicos y producen efectos aversivos (SINCLAIR, 1990).

Sin embargo, la utilización de inhibidores de la ALDH también ha puesto de manifiesto la acción contraria, de esta forma se ha visto que pequeñas cantidades de etanol en interacción con los efectos de los inhibidores puede resultar reforzante (AMIT Y OTROS, 1980).

Así, los datos presentados por otros autores indican que concentraciones de etanol que en un principio no ejercen ningún efecto en el sujeto, tras la inhibición de la ALDH por la administración previa de un inhibidor de este enzima genera en los sujetos efectos reforzantes. En este sentido, se ha informado que a dosis de etanol bajas, algunos sujetos no alcohólicos experimentan una euforia asociada a un aumento en la concentración de AcH (BROWN Y OTROS, 1983). Este planteamiento pone de relieve la implicación de la ALDH en los efectos reforzantes del etanol. Los datos que se presentan a continuación van en ese sentido, planteando que la ALDH interacciona con el etanol y metaboliza AcH a nivel central.

En este sentido, aunque siempre se ha planteado que la cianamida y otras drogas similares reducían la ingesta de alcohol por la acumulación tóxica de AcH, varios estudios han informado de que la prevención de la elevación de los niveles de AcH en sangre por un tratamiento concurrente de cianamida y 4-MP en ratas da como resultado una supresión de varias conductas como la ingesta de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981), el CAS inducido por etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987a) y la actividad motora también inducida por etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987b). Este grupo de autores ha indicado que la supresión ejercida por la cianamida, de las conductas inducidas por etanol, podría ser debida a su inhibición directa de la ALDH cerebral y no a la elevación de los niveles de AcH en sangre ocasionados por la mencionada inhibición ya que el 4-MP, mediante el efecto inhibitorio que ejerce sobre la ADH disminuye la acumulación periférica de AcH anulando de ese modo la mencionada toxicidad. Además, otros resultados indican una relación directa entre actividad de la ALDH cerebral y el consumo voluntario de etanol en ratas (AMIR, 1977; 1978; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SOCARANSKY Y OTROS, 1984; 1985).

Respecto a la conducta de ingesta de alcohol, Sinclair y Lindros, (1981) obtuvieron que la administración de 4-MP, que disminuye los niveles de AcH en sangre, no modifica la supresión de la ingesta de etanol producida por la cianamida. Aunque la actividad de la ALDH fue prácticamente la misma para el grupo de cianamida que para el grupo pretratado con 4-MP y posteriormente con cianamida, ambos tuvieron actividades significativamente menores que el grupo control.

Así, se puede observar que la cianamida inhibe la ingesta de etanol incluso en ausencia de acumulación de AcH periférico probablemente por alguna acción relacionada con su inhibición directa de la ALDH cerebral ya que con este procedimiento se alteran los dos factores, los niveles de AcH y la ingesta de alcohol, de forma independiente por lo que los niveles de AcH no fueron relacionados con la conducta de ingesta de alcohol. Otra explicación para esos resultados es que el 4-MP provoque una reducción en la capacidad metabólica para eliminar etanol de forma que para los animales fuera imposible mantener los altos niveles de ingesta de etanol. Sin embargo, una explicación complementaria nos llevaría a pensar que si la actividad de la catalasa también se encuentra inhibida por la cianamida (DEMASTER Y OTROS, 1986), no se obtendría AcH periférico en la misma proporción que sin el efecto de esa inhibición lo cual podría traducirse en que la cantidad de AcH necesario para producir los efectos psicofarmacológicos no se obtuviera y por eso se observaría en los animales una disminución o supresión de la ingesta de alcohol.

En un intento de aumentar la base de datos existente se realizaron estudios (SOCARANSKY Y OTROS, 1984) en los que se evaluó la relación de la actividad de la ALDH y la ingesta voluntaria de etanol en tres cepas de ratas, Long-Evans, Wistar y Sprague-Dawley, utilizadas con frecuencia en la realización de experimentos. Los resultados de este estudio, al igual que otros anteriores (AMIR, 1977), indican que aunque las cantidades de etanol consumidas por las tres cepas no difiere significativamente y tampoco los niveles de actividad de la ALDH, sin embargo, los niveles de consumo de alcohol correlacionaron significativamente mejor con la actividad de la ALDH cerebral para metabolizar aldehído que con la actividad de la ALDH hepática para la misma función. Y, al igual que Amir (1977), demuestran que ya que los niveles de actividad de la ALDH cerebral no difieren significativamente entre los animales control y los experimentales tratados con etanol, las diferencias en ALDH cerebral no están producidas por la ingesta de alcohol, sino que son características genéticas previas que podrían determinar el consumo posterior de etanol.

En este sentido van también los datos de Socaransky y otros (1985) en los que se demuestra una correlación alta y consistente entre la capacidad central, no de la periférica, de oxidar aldehído y la propensión del organismo a autoadministrarse etanol (SOCARANSKY Y OTROS, 1985), poniendo de manifiesto que la ALDH tiene un determinado papel en la mediación de la respuesta conductual del etanol. Estos autores obtuvieron una correlación

estadísticamente significativa entre la actividad de la ALDH mitocondrial de baja  $K_m$  y la ingesta de etanol de ratas de la cepa Long Evans expuestas a un paradigma de días alternos de libre elección al etanol al que fueron expuestas durante ocho semanas. Tras este tratamiento se analizó la actividad de la ALDH.

Los resultados presentados aquí confirman los obtenidos anteriormente por otros autores indicando una relación entre la actividad de la ALDH y el consumo de etanol (AMIR, 1977; AMIR, 1978a, b; SOCARANSKY Y OTROS, 1984; SINCLAIR Y LINDROS, 1979). Y apoyan la idea de que la actividad de la ALDH cerebral está implicada en la regulación de la ingesta voluntaria de etanol.

Como se ha visto, la preferencia por el etanol ha sido positivamente correlacionada con la ALDH (AMIR, 1977; 1978a, b), una posible interpretación de estos datos es su papel como indicadores de que el AcH está implicado de alguna forma en el mecanismo subyacente al desarrollo de la preferencia por el alcohol (AMIT Y OTROS, 1980). En conjunto, todos estos datos muestran un papel para la ALDH cerebral en el consumo de etanol.

Por su parte, Spivak y Amit (1987) evaluaron la eficacia farmacológica de la ingesta de etanol mediante *bouts* realizando varias manipulaciones enzimáticas utilizando cianamida, y pusieron de manifiesto la existencia de una serie de efectos paradójicos. Así, la administración de esta sustancia previa a la exposición del animal, en este caso a ratas, a un acceso restringido durante diez minutos al etanol generó un incremento significativo en la cantidad de etanol consumido. Los animales pertenecientes a los grupos pretratados con cianamida consumieron significativamente más cantidad de alcohol. Además, las pruebas *a posteriori* pusieron de manifiesto que los animales del grupo pretratado con 4-MP consumen más etanol que los pretratados con salina. Sin embargo, el efecto de la cianamida en este estudio no puede ser atribuido a una elevación en sangre de los niveles periféricos de AcH ya que, como se ha visto, el pretratamiento con 4-MP previene esta acumulación de AcH en la periferia del organismo (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y OTROS, 1987a) y, en el grupo pretratado con 4-MP se observan también aumentos en la ingesta de alcohol.

Como puede verse, la única condición que comparten los grupos es la inhibición de la ALDH ejercida por la cianamida. Además, estos datos estarían indicando una función para las enzimas que metabolizan etanol a nivel central en la regulación de la ingesta de alcohol

también mediante una regulación, en este caso de los niveles de AcH en el cerebro (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987).

La implicación de la ALDH en la mediación de los efectos del etanol también se ha evaluado mediante el paradigma del CAS. Así, en un intento de determinar el papel del AcH periférico y central en el CAS inducido por etanol en ratas, Spivak y otros, (1987a) observaron que en los grupos tratados con cianamida se da una reducción de la ingesta de sacarina tras el condicionamiento. Este hecho, al igual que en los experimentos anteriores no se puede atribuir al AcH periférico, porque el pretratamiento con 4-MP lo previene. Y de nuevo, lo común a ambos grupos es la inhibición de la ALDH cerebral por la acción de la cianamida.

Se ha visto también que los animales pretratados con cianamida redujeron la ingesta de sacarina tras la administración de una dosis baja de etanol (0.4 g/kg) mientras que no se observó esta reducción en los grupos control. Y, de nuevo, este efecto no puede ser atribuido a los niveles de AcH en sangre porque en el grupo pretratado con 4-MP, que no tenía los niveles de AcH en sangre aumentados también se obtuvo una reducción de la ingesta de sacarina. Además, en el condicionamiento a la dosis de etanol (1.2 g/kg), la magnitud del CAS para los grupos tratados con cianamida fue significativamente menor que la observada para los grupos control.

Nuevamente los resultados indican que el AcH y la ALDH cerebral pueden mediar conductas inducidas por etanol, en este caso, las propiedades del CAS inducido por etanol.

Se podría plantear que la alteración en la ALDH cerebral por la cianamida podría haber potenciado las propiedades farmacológicas de una dosis subumbral de etanol. Esta idea es congruente con los datos anteriores obtenidos en humanos pretratados con cianamida o disulfirán y tratados posteriormente con bajas dosis de etanol que informan de aumentos en el humor y en la euforia cuando son comparados con los sujetos pertenecientes al grupo control que no informaron de esos efectos tras la exposición a las mismas dosis de etanol (BROWN Y OTROS, 1983).

Cabría resaltar que ese efecto de potenciación de las dosis menores de etanol no fue observado para las dosis mayores (1.2 g/kg de etanol). En este sentido, se podría afirmar que la cianamida tiene un efecto dependiente de la dosis y que este además tiene una naturaleza bifásica. Quizá este efecto bifásico de la cianamida, potenciación de las dosis menores de

etanol y atenuación de las dosis mayores, esté reflejando alteraciones en las propiedades discriminables del etanol como consecuencia de alguno de los efectos interactivos de la inhibición de las actividades tanto de la catalasa cerebral como de la ALDH cerebral a bajas y a altas dosis de etanol.

Otro de los paradigmas utilizados para determinar la implicación enzimática en la oxidación del AcH ha sido la actividad locomotora. También en este caso (SPIVAK Y OTROS, 1987b) se utilizó como sustancia de tratamiento la cianamida. Los datos obtenidos indican que al igual que en el caso del CAS los niveles elevados de AcH en sangre pueden no ser un factor contributivo en la mediación de los efectos del etanol dentro del rango de dosis evaluado.

En conjunto, los datos indicarían que la actividad locomotora de los animales pretratados con cianamida, fue significativamente menor que la de los grupos control. Este efecto fue particularmente evidente para las dos dosis menores de etanol (0.4, 0.8 g/kg). Sin embargo, a la dosis de 1.2 g/kg de etanol, los animales pretratados con cianamida sola no mostraron un aumento de la depresión locomotora aunque los niveles de AcH en sangre que presentaban fueron los mayores que se obtuvieron con las dosis de etanol utilizadas.

Los resultados obtenidos en este estudio son inconsistentes con los obtenidos por Spivak y Amit (1987) en los que los animales pretratados con cianamida sola demostraron depresión locomotora tras ingesta de etanol mediante el procedimiento del *bout*. Las discrepancias entre este estudio y el de ingesta podrían deberse a la diferencia en el procedimiento experimental. En el experimento de ingesta los animales consumían el etanol voluntariamente y eran evaluados durante un periodo de diez minutos tras un intervalo de diez minutos después de la ingesta de etanol. Además, en este estudio, los animales eran inyectados con etanol i.p. y evaluados un minuto después de la inyección. Así, el método, la ruta de administración y el periodo de intervalo postinyección eran diferentes lo cual puede traducirse en variables adicionales que contribuyen a las diferencias observadas entre ambos estudios.

Aunque los mecanismos que subyacen al efecto bifásico observado para la cianamida no están claros. Dado que algunos autores han informado del curso de la catalasa en la conversión de la cianamida en un metabolito activo (CEDERBAUM Y DICKER, 1985; DEMASTER Y OTROS, 1986) de forma que la catalasa también está inhibida, esta inhibición podría explicar la acción bifásica que produce la cianamida.



En este sentido, DeMaster y otros (1986) han demostrado que el pretratamiento con 0.68 mM (28.6 mg/kg) de cianamida inhibió aproximadamente el 50% de la actividad de la catalasa cerebral. De forma que quizá el efecto bifásico observado tras el tratamiento con cianamida en este estudio –potenciación a bajas dosis y atenuación a altas dosis de etanol– podría reflejar algunos efectos interactivos de la inhibición de la actividad enzimática tanto de la catalasa cerebral como de la ALDH cerebral.

Es posible que los efectos de la cianamida sobre la actividad locomotora inducida por etanol puedan ser atribuidos a cambios en la actividad de la catalasa que sean independientes de alteraciones de la actividad de la ALDH. A partir de esta idea, se podría esperar que la cianamida produjera una inhibición dependiente de la dosis de cianamida utilizada con el incremento en las dosis de etanol administradas. Sin embargo, en este estudio los animales tienden a mostrar mayor supresión a las dosis menores y menos depresión locomotora a las dosis mayores. Una explicación más parsimoniosa sería aquella que plantea un efecto interactivo entre catalasa cerebral y ALDH que contribuyera así al efecto bifásico observado.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que, al igual que los anteriores, la acumulación periférica de AcH no es el factor que contribuye a la alteración de los efectos locomotores producidos por etanol. Quizá los enzimas implicados en la formación y degradación del AcH, catalasa y ALDH cerebrales, tengan una función mediadora en los efectos del etanol sobre la actividad locomotora.

Estos sistemas enzimáticos pueden ejercer sus efectos regulando la formación y la degradación de los niveles de AcH centrales. Esta idea es apoyada por los resultados obtenidos en la manipulación de la catalasa y la ALDH cerebrales que como ya se ha visto da como resultado una serie de alteraciones en las conductas relacionadas con el etanol como la ingesta (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987), el CAS (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; SPIVAK Y OTROS, 1987a) y la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b). Estos datos junto con otros (AMIR, 1977; AMIT Y OTROS, 1977b; SOCARANSKY Y OTROS, 1984; ARAGÓN Y AMIT, 1985) sugieren que los enzimas responsables de la formación y degradación del AcH central, quizá mediante la regulación de los niveles de AcH en el cerebro, pueden desempeñar un papel en la mediación de algunas de las acciones farmacológicas del etanol.

Los estudios correlacionales también aportan datos congruentes con una implicación de la ALDH central en las conductas del etanol. En este sentido, aunque la actividad de la ALDH cerebral tuvo una correlación moderada con la ingesta absoluta de ratas Wistar tras 50 días de libre acceso al etanol esta fue significativamente mayor que la obtenida para la actividad de la ALDH hepática. En los animales que regulan la ingesta en función de las variaciones en las concentraciones de etanol, los datos indican, para ambas, una correlación significativa sin diferencias entre ellas. En animales con ingesta irregular, es decir, en los que existe una mayor variabilidad en el patrón de consumo, la ALDH cerebral predijo el consumo posterior de etanol mejor que la ALDH hepática.

Esto podría indicar que aunque ambas enzimas puedan mediar el consumo de etanol en ratas regulando algunos aspectos de las relaciones efecto y dosis entre el AcH y el etanol (AMIR, 1977) la ALDH cerebral podría estar relacionada más directamente con la mediación de la preferencia por etanol que la ALDH hepática. Las diferencias en las correlaciones entre ALDH cerebral y hepática entre los animales que beben con regularidad y los que no lo hacen puede sugerir la posibilidad de que la ALDH cerebral y hepática puedan servir para diferentes funciones relacionadas con el etanol regulando aspectos diferentes del destino metabólico del AcH.

Además, también se ha mostrado que la actividad global de la ALDH en el cerebro correlacionó con los niveles de ingesta de etanol en ratas bajo una amplia variedad de manipulaciones y condiciones. Así, se ha obtenido una elevada correlación entre los niveles de consumo voluntario de etanol y la actividad de la ALDH mitocondrial (ARAGÓN Y AMIT, 1985). Estos datos son similares o van en la misma dirección que los obtenidos por otros autores (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; SOCARANSKY Y OTROS, 1985) y parecen sugerir, como en el caso de la catalasa cerebral, una relación causal no directa entre la actividad enzimática cerebral y la ingesta de etanol (AMIR, 1978a, b; SINCLAIR Y LINDROS, 1979; SOCARANSKY Y OTROS, 1984).

Se ha confirmado que diferentes acciones del etanol se ven mediadas por los sistemas enzimáticos implicados en su metabolismo, lo que se observa a través de diferentes acciones conductuales. Así, la ALDH podría ejercer su efecto regulando los niveles cerebrales de AcH, esta idea se apoya en los resultados de las manipulaciones de la catalasa o de la ALDH cerebrales que dan como resultado una alteración de las conductas relacionadas con el alcohol,

como son la ingesta de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981), el CAS (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; SPIVAK Y OTROS, 1987a) o la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b).

Aunque algunos autores (ARAGÓN Y OTROS, 1985b) informaron de que el pretratamiento con AT bloqueaba la depresión motora inducida por etanol en ratas. Spivak y otros, (1987b) han demostrado que en los grupos tratados con cianamida aumenta la depresión locomotora. Estos datos, como ejemplo, junto con otros anteriores aunque sugieren una implicación enzimática en la formación y degradación del AcH central y su implicación en las acciones psicofarmacológicas del etanol y ponen también de manifiesto los problemas y la no siempre congruencia de los datos obtenidos.

Todo ello lleva a plantear la necesidad de la realización de un estudio que permita consolidar la función de los enzimas que controlan la formación y la degradación de AcH al mismo tiempo que permita determinar la implicación indirecta de estos enzimas en los efectos del etanol y la posible participación directa del AcH en algunas de las acciones psicofarmacológicas del etanol.

En este sentido, si los niveles de AcH en el cerebro son el parámetro fisiológico que determina los efectos del etanol, variaciones en la capacidad metabólica podría generar un aumento que permitiera diferenciar las respuestas conductuales. Así, la manipulación enzimática del metabolismo del etanol mediante la alteración de algunos de los enzimas implicados –ADH, catalasa y ALDH– podría permitir afirmar no solo la existencia de un metabolismo central del etanol sino también, y más importante si cabe, determinar si es el AcH el responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol

En función de lo anterior, las sustancias que se han utilizado en esta Tesis Doctoral permiten el estudio global de toda la ecuación que da cuenta del metabolismo del etanol.

Así, la utilización del AT se planteó dado que aunque es uno de los inhibidores más utilizados de la catalasa no se había realizado ningún estudio que permitiera sistematizar su acción mediante diferentes dosis y tiempos. Además, como ya se planteó, desde el trabajo recogido en esta Tesis se pretende abarcar toda la curva metabólica del etanol, para ello se empezó con los estudios enfocados a la implicación de la catalasa y posteriormente se realizaron los que supondrían una implicación de la ALDH, y es en ese primer caso en el que la evaluación de una sustancia como el AT cobra todo su sentido.

En una segunda fase, se realizó el análisis del DDTC, esta sustancia es relevante por ser metabolito de una de las drogas que se emplean con mayor frecuencia en el tratamiento del alcoholismo, el disulfirán, también debido a la escasa utilización de la misma en experimentos conductuales, de hecho la mayor parte de estudios se han realizado para determinar su efecto en relación con su semejanza con la acción del disulfirán u otros metabolitos de esta sustancia. Además, la relevancia está también contenida en el hecho de que esta sustancia ejerce su acción inhibitoria, a diferencia de la cianamida, solo sobre la actividad del enzima ALDH y no sobre la catalasa. Este último hecho permite el estudio de la implicación de la ALDH en el metabolismo del etanol de forma exclusiva ya que al no producirse la inhibición de la catalasa, los resultados que se obtienen serían únicamente reflejo de la acción de la ALDH.

Por su parte, el análisis de la cianamida permite, en primer lugar, analizar una sustancia que supone una alternativa al inhibidor de la catalasa utilizado con mayor frecuencia el AT, en segundo, que aunque ha sido empleada en algunos estudios, los resultados que se han obtenido en la literatura son algo contradictorios y, finalmente, que supone la posibilidad de estudiar la acción conjunta de los enzimas catalasa y ALDH en el metabolismo del etanol.

A continuación se expone el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral.

## **SEGUNDA PARTE: DESARROLLO EXPERIMENTAL**

## **I. OBJETIVOS.**

### **1.- Objetivos generales.**

A partir de la literatura científica revisada así como de los resultados obtenidos en diferentes investigaciones, el objetivo general que persigue este trabajo es determinar el papel de los enzimas cerebrales –catalasa y ALDH– en las conductas inducidas por el etanol.

En este sentido, como ya se indicó en la introducción, los cambios observados en la conducta de los animales tras la manipulación farmacológica de estas enzimas permitiría establecer la relación de los mencionados enzimas con las acciones del etanol.

Por lo tanto, y en función de lo anterior, en los experimentos que se recogen en esta Tesis se evalúa la influencia de una serie de sustancias como son el AT, el DDTC y la cianamida sobre la actividad de ambas enzimas y su posible mediación en los cambios observados en una de las conductas inducidas por el etanol como es la actividad locomotora.

### **2.- Objetivos específicos.**

Uno de los primeros objetivos fueron establecer los parámetros óptimos, tanto temporales como de dosis, para la utilización del AT en la evaluación de la influencia de la catalasa sobre las acciones del etanol. Para ello se ha realizado un estudio sistemático sobre las condiciones más adecuadas en cuanto a su acción como inhibidor de esta enzima.

Otro de los objetivos que se plantearon en este trabajo fue la determinación del efecto que ejerce el DDTC sobre la actividad de la ALDH, ya que aun siendo uno de los metabolitos de una de las sustancias que más se utilizan en el tratamiento del alcoholismo su evaluación ha sido escasa.

En función de lo anterior, la utilización del DDTC, también comprendía otro objetivo, este hace referencia a la comprobación de la posible existencia de un patrón diferencial de inhibición que esta sustancia produciría sobre la ALDH frente al ejercido por la cianamida.

En cuanto a la cianamida, y dado que la bibliografía revisada pone de manifiesto que la acción de esta sustancia en relación con el etanol arroja resultados contradictorios y

paradójicos, ha sido objetivo de esta Tesis, por una parte, evaluar el efecto de esta sustancia para establecer de forma más clara y sistemática su acción y, por otra, determinar la influencia de la manipulación conjunta de la catalasa y la ALDH sobre el etanol.

Por último, también se ha planteado aumentar, mediante las manipulaciones comentadas, el caudal de datos referentes a la implicación del AcH en algunas de las conductas inducidas por el etanol.

## II. PLAN DE TRABAJO.

El trabajo experimental que se expone a continuación se presenta dividido en cuatro fases correspondientes a la secuencia que ha estructurado la experimentación.

En la primera fase se realiza el estudio sistemático del efecto del AT sobre la actividad locomotora inducida por etanol y sobre la actividad de la catalasa cerebral. Esta fase está integrada por el estudio de dosis de etanol y otro de dosis de AT con el objetivo de determinar, por una parte, la acción del etanol sobre la actividad locomotora y, por otra, el efecto del AT sobre la acción que el etanol tuviera sobre la locomoción de los ratones. Se evalúa también el efecto del intervalo temporal entre la administración de ambas sustancias para establecer cuál es el intervalo de actuación del AT así como el momento a partir del cual se recupera la actividad afectada por esta sustancia. Finalmente se mide la actividad de la catalasa encefálica con la finalidad de evaluar el nivel de correlación entre los datos conductuales y los bioquímicos.

Una segunda fase comprende el estudio del efecto del 4-MP sobre la deambulación espontánea así como sobre la inducida por etanol. Los experimentos realizados se orientan a determinar la inocuidad de esta sustancia en diferentes intervalos de tiempo debido a su utilización como herramienta farmacológica en experimentos posteriores.

En la tercera fase experimental se evalúa el efecto del DDTC sobre la actividad locomotora inducida por etanol y en la espontánea de los ratones en un campo abierto. Tras esto, se realiza un estudio de dosis de etanol debido a que los intervalos temporales en los que se administraba habían sido modificados para ajustarse a este nuevo inhibidor, el DDTC. Posteriormente se evalúa el efecto que el pretratamiento combinado de DDTC y 4-MP sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Por último, se aborda un estudio de dosis del DDTC, en este los ratones son tratados con varias dosis de DDTC administradas junto con 4-MP para evaluar si su acción conjunta, sobre el efecto del etanol y sobre la actividad locomotora espontánea, se mantiene a través de distintas dosis.

En la fase cuarta se analiza la acción de la cianamida realizando para ello un estudio de dosis de misma y el efecto que pudieran tener sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por etanol. Como en la fase tercera, se lleva a cabo un estudio de dosis de etanol para



establecer su curva de actividad en un protocolo temporal distinto y afín al de la administración del nuevo inhibidor. Tras esto, se realiza la evaluación del efecto conjunto de la administración de cianamida y 4-MP sobre la actividad locomotora inducida por etanol y la deambulación espontánea de los animales. Finalmente, se aborda la evaluación de ese tratamiento combinado con diferentes dosis de cianamida.

Todos los experimentos a los que se ha hecho referencia se acompañan de sus correspondientes grupos control.

### **III. MATERIALES Y MÉTODO**

En este apartado se presentan los aspectos comunes en cuanto a la metodología y los materiales a todos los experimentos que integran este trabajo. El protocolo experimental y temporal propio de cada uno de ellos será descrito con mayor detalle en cada uno de los mencionados experimentos.

#### **1.- Sujetos.**

Los animales utilizados en los experimentos que integran el presente trabajo fueron ratones macho de las cepas Swis-Webster (Charles River CD1, Criffa S.A., Barcelona) y Swiss Albino (Harlan Sprague Dawley Co. Interfauna, Barcelona). A su llegada al laboratorio los animales tenían cuatro semanas de edad y tenían en ese momento un peso promedio de  $20 \pm 2$  gramos.

Para cada uno de los grupos que conforman los experimentos conductuales se utilizaron ocho animales por condición experimental, para los ensayos bioquímicos se emplearon seis animales para cada una de las condiciones experimentales.

#### **2.- Condiciones de alojamiento.**

El día de su llegada, tras el registro del peso, los animales fueron alojados en jaulas, por grupos de cuatro, y asignados aleatoriamente a los grupos experimental o control.

En todas las salas del estabulario se mantuvo una temperatura media de  $21 \pm 2$  C, así como una humedad promedio del 55%.

Del mismo modo, en todas las salas del estabulario los animales estuvieron bajo luminosidad artificial estando esta sometida a ciclos regulares de doce horas de luz y doce de oscuridad.

Por otra parte, en las salas donde se realizaron las pruebas conductuales se mantuvieron también las mismas condiciones de temperatura y humedad presentes en los estabularios. La fuente de luz en estas salas era tenue y constante.

Los estudios se realizaron entre la segunda y la quinta hora del ciclo de luz de los animales, respetando el mismo intervalo temporal con la finalidad de obtener mayor control experimental y, al mismo tiempo, una mayor fiabilidad en la interpretación de los resultados.

### **3.- Dieta.**

Todos los animales disponían, desde el momento de su alojamiento en el laboratorio, libre acceso a la comida y al agua.

La dieta sólida consistió en un preparado especial formado por *pellets* de comida para ratones (Panlab, S.L.). Este preparado alimenticio fue la única fuente de alimentación para los animales durante su estancia en el estabulario.

La dieta líquida fue en todos los casos agua potable.

### **4.- Estudios conductuales y bioquímicos.**

El diseño experimental que se ha seguido en este trabajo está integrado por dos tipos de experimentación, la conductual y la bioquímica. En el primer caso, se evaluó la actividad locomotora. La elección de esta conducta se basó en la idea de que el estudio de esta conducta puede proporcionar una clara comprensión de los mecanismos neurales afectados por diferentes tipos de drogas, entre ellas las de abuso, como el etanol (KELLEY, 1993; PHILLIPS Y SHEN, 1996), además de la facilidad y objetividad de su registro.

Por su parte, la medida bioquímica de la manipulación farmacológica realizada indicaría la posible existencia de cambios en el sistema enzimático formado por la catalasa. Para la manipulación de la actividad de este enzima se administró AT.

#### **4.1.- Estudios conductuales.**

##### **4.1.1.- Sustancias.**

En el presente estudio se utilizaron las siguientes sustancias:

- Aminotriazol (3-amino-1,2,4-triazole. Sigma, S.L.).  $C_2H_4N_4$ . Peso molecular: 84.08. La concentración de la solución estándar utilizada fue de 1 g AT/20 ml salina. Las dosis administradas fueron 0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 g/kg.

- 4-Metilpirazol (4-Methylpyrazole. Sigma, S.L.).  $C_5H_6N_2O_2$ . Peso molecular: 126.11. La concentración de la solución estándar fue de 20 mg 4-MP/20 ml salina. La dosis utilizada fue de 10 mg/kg.

- Ácido dietildithiocarbamato (Diethyldithiocarbamic acid sodium salt trihydrate; diethyldithiocarbamate sodium. Sigma, S.L.).  $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$ . Peso molecular: 225.3. La concentración de la solución estándar utilizada fue de 114 mg DDTC/10 ml salina. Las dosis empleadas fueron 0, 114, 228, 456 mg/kg.

- Cianamida (Calcium cyanamide. Sigma, S.L.).  $CH_2N_2$ . Peso molecular: 42.04. La concentración de la solución estándar fue de 50 mg cianamida/20 ml salina. Las dosis utilizadas fueron 0, 12.5, 25 y 50 mg/kg.

- Etanol (Alcohol etílico de 96°. Panreac Química, S.L.). Las diferentes dosis empleadas se tomaron de una solución estándar preparada cuya concentración fue del 20% v/v en solución salina. Las dosis empleadas fueron 0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg.

- Salina (Cloruro sódico. Panreac, S.L.).

Para la disolución de todas las drogas anteriormente enumeradas se utilizó una solución salina.

La vía de administración para todas estas drogas fue la intraperitoneal (i.p.).

#### **4.1.2.- Aparataje.**

Para la medida de la actividad locomotora fue utilizado un aparato de campo abierto consistente en un cilindro de cristal transparente de veinticinco centímetros de diámetro por treinta centímetros de altura.

Este cilindro presentaba en su base cuatro divisiones realizadas mediante el trazado de dos líneas negras perpendiculares entre sí, lo que delimitaba la existencia de cuatro cuadrantes de igual superficie.

#### **4.1.3.- Procedimiento experimental.**

Los experimentos conductuales se llevaron a cabo tras una semana de habituación y aclimatación de los animales a las condiciones del estabulario, así el día de la prueba estos contaban con cinco semanas de edad y un peso promedio de  $30 \pm 2$  gramos.

El día de la prueba conductual, a los animales se les retiraba la comida y la bebida e inmediatamente, eran pesados de manera individual para el cálculo del volumen a inyectar de la dosis de la sustancia que conformara el experimento o en su defecto la dosis de solución salina.

Tras la inyección de la droga o de la solución salina, y en función del protocolo temporal que rigiera el experimento el ratón o era devuelto a su jaula hasta el momento de la prueba conductual o era situado inmediatamente en el aparato de campo abierto para su evaluación. El tiempo de permanencia en el campo abierto fue en todos los casos de veinte minutos, de los cuales solo se registraba para la prueba la actividad locomotora de los diez últimos minutos del intervalo temporal. Los primeros diez minutos no se computaron con el objetivo de reducir el efecto de determinadas variables contaminantes como pueden ser la novedad, la absorción de la droga y la manipulación del animal entre otras (KELLEY, 1993).

Por otra parte, se consideró como medida de locomoción (desplazamiento o cuenta), cada vez que el ratón cruzaba desde un cuadrante a otro con las cuatro patas.

## **4.2.- Estudios bioquímicos.**

### **4.2.1.- Productos químicos.**

Las sustancias utilizadas en los ensayos bioquímicos de la catalasa cerebral y la posterior cuantificación de proteínas fueron:

- Ketamina, la solución de ketamina era de 5 g en 10 ml contenida en un preparado comercial (Imalgene. Rhone Merieux Labs.) de la que se tomó 1 ml que se disolvió en 9 ml de agua destilada. Esta sustancia fue utilizada como anestésico de los animales antes de sacrificarlos para la extracción de las muestras de tejido. La vía de administración fue la i.p.

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

- Heparina (Sigma Aldrich S.A.). Se utilizaron 1000 unidades disueltas en un litro de una solución con agua destilada y cloruro sódico al 0.9%. Esta sustancia se utilizó para evitar la coagulación de la sangre de los animales durante la perfusión de los mismos.

- Potasio di-hidrógeno-fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Panreac Química, S.L.). Preparado en una disolución estándar de 6.81 g en 1000 ml de agua destilada.

- Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Panreac Química, S.L.). Preparado en una disolución de 8.9 g en un volumen total de 1000 ml.

Para la preparación del tampón fosfato (50 mM) se utilizaron las dos diluciones anteriores en una proporción 1/1.5 respectivamente.

- Peróxido de hidrógeno (Hydrogen peroxyde, 30%. Sigma Aldrich S.A.). Preparado a una concentración del 5 mM (34 ml/ 5 ml del tampón fosfato). Utilizado como sustrato para la detección de la actividad enzimática.

- Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid. Panreac Química, S.L.). Preparado al 6.25% utilizando como solvente H<sub>2</sub>O destilada.

#### **4.2.2.- Aparataje.**

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

El espectrofotómetro utilizado fue el modelo DU 640 (Beckman Co.). Las cubetas utilizadas poseían 10 mm de espesor y estaban fabricadas en cuarzo. Con los reactivos se confeccionó 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 (1984).

Los ensayos bioquímicos se realizaron a partir de cerebros congelados de ratones similares en cuanto a la cepa, peso y edad a los utilizados en las mediciones conductuales. Para la evaluación de la actividad de la catalasa cerebral se utilizaron muestras homogeneizadas de cerebros que eran 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. Las muestras fueron inmediatamente conservadas a -80 C hasta el momento de su análisis.

#### **4.2.3.- Procedimiento experimental.**

A continuación se describe el protocolo que sigue el ensayo bioquímico de estas muestras para la determinación de la actividad de la catalasa cerebral.

Los cerebros eran pesados y se calculaba el volumen de digitonina, (0.01%) en relación con el 10% del peso del cerebro. Posteriormente eran homogeneizados en un tampón de fosfato (50 mmol/l; pH de 7.0).

De la solución obtenida se tomó una muestra de 1.7 ml para someterla a un proceso de centrifugación de 10000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf. Las alícuotas de sobrenadante (100 µl) fueron añadidas a 825 µl de tampón fosfato y se utilizaron como blanco en las posteriores mediciones de la actividad de la catalasa. Se realizó un blanco para cada uno de los ensayos así como tres ensayos para cada una de las muestras.

Cada uno de los ensayos presentaba una duración de dos minutos y las medidas obtenidas se promediaban para cada 15 segundos.

Cada ensayo consistió en la adición a la preparación denominada como blanco de 150 µl de la solución de peróxido de hidrógeno (30 mmol/l). Tras esto se agitaba la cubeta que contenía la nueva preparación y se introducía inmediatamente en el espectrofotómetro para su medición.

La obtención del valor final de la actividad para cada uno de los ensayos fue promediado junto con otros dos idénticos, obteniéndose así una actividad final que se ponía en relación con la cantidad total de proteínas contenidas en los 100 µl de la preparación de la muestra de cerebro homogeneizado.

La actividad de la catalasa fue evaluada, mediante espectrofotometría ultravioleta en los supernadantes, midiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno a partir del decremento en absorbancia a una longitud de onda de 240 nm ( $\epsilon_{240} = 0.0394 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) (AEBI, 1984). Las diferencias obtenidas en la absorbancia, en relación a una unidad de tiempo, son una medida adecuada de la actividad de la catalasa.

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.

Así, la variable dependiente que se utilizó 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  / min / mg proteína).



## **IV. FASES EXPERIMENTALES.**

### **1.- Fase I: Efecto de la administración de AT.**

#### **1.1.- Introducción teórica.**

##### **1.1.1.- Aspectos generales.**

Según la clasificación del Merck Index (1989), el 3-amino-1,2,4-triazol (AT) es un compuesto que presenta la siguiente composición química:

28.57 % de carbono

4.80 % de hidrógeno

66.64 % de nitrógeno

A temperatura ambiente esta sustancia presenta la estructura de un sólido cristalino de color blanco. Entre sus propiedades químicas está su elevada solubilidad en agua, metanol, etanol y cloroformo, su insolubilidad en éter y acetona, así como su solubilidad media en acetato de etilo.

En relación con su efectividad el AT pertenece a los herbicidas no selectivos, además, se ha observado que la mayor parte de las alteraciones histopatológicas que genera la administración de AT pueden ser comparadas con las que causan otras sustancias tóxicas como los insecticidas y los fungicidas (FLEISCHER Y OTROS, 1980; KASZA Y OTROS, 1978; JONSONN Y OTROS, 1981).

En este sentido, los efectos tóxicos causados por el AT en animales se conocen desde hace tiempo. Así, por ejemplo, la aplicación oral y crónica del herbicida en ratas conlleva una respuesta antitiroidea (WEIR Y OTROS, 1958; ALEXANDER, 1959; GAINES Y OTROS, 1973).

Por otra parte, se ha informado de que del mismo modo que se obtiene una reducción en la catalasa tras la implantación de un tumor (GREESTAIN, 1954; HEIM Y OTROS, 1955), la inhibición que se observa tras la administración i.p. de AT es similar a la reducción que se da

en la actividad de la catalasa cuando se desarrolla un neoplasma en el organismo (GREESTEIN, 1954).

Por otro lado, se han reproducido *in vivo* los cambios que se dan en la catalasa producidos por un cáncer huésped usando AT en animales normales (HEIM Y OTROS, 1955).

Sin embargo, la acción del AT en los órganos animales va más allá de su acción inhibitoria sobre el enzima catalasa. Así, mientras que tras la inyección de AT en ratas el contenido de lípidos del serum no cambió sustancialmente (ISHII Y OTROS, 1977a), la síntesis de colesterol y de ácidos grasos sufrió una inhibición significativa. Por otra parte, aunque el AT afecta directamente a los dos procesos de síntesis, sin embargo, la acción ejercida por esta sustancia sobre la síntesis del colesterol es más intensa que la ejercida sobre los ácidos grasos. Este efecto inhibitorio del AT ha sido observado también en porciones de hígado en la lipogénesis de los hepatocitos de la rata (ISHII Y OTROS, 1977a; BEYNEN Y OTROS, 1981).

Otros resultados indican que el AT inhibe el acetil-CoA carboxilasa (BEYNEN Y OTROS, 1981), un enzima implicado en la biosíntesis de los ácidos grasos no afectando, sin embargo, a la actividad del acetil-CoA carboxilasa en los homogenados de los hepatocitos.

Por otra parte, se ha demostrado que el AT actúa directamente sobre la esterificación del metabolismo de los triglicéridos (TG), disminuyendo sensiblemente el nivel de los mismos en el hígado (ISHII Y OTROS, 1977a, b). Este decremento en los niveles de TG hepáticos no es dependiente de la disminución de la catalasa en el hígado ya que no se ha observado una relación paralela entre la actividad de la catalasa hepática y los niveles de TG. Parece ser por tanto, que el AT actúa de forma independiente, por una parte, sobre la actividad de la catalasa y, por otra, sobre el metabolismo de TG.

A partir de los datos anteriores podríamos concluir que el AT tiene distintos efectos sobre el organismo, pero de todos ellos el más característico es su efecto inhibitorio sobre el enzima catalasa.

### **1.1.2.- Estudios *in vitro*.**

Los estudios orientados a la evaluación de la posible acción del AT sobre la actividad del enzima catalasa muestran que, *in vitro*, la adición de AT a homogenados animales,

preparaciones de catalasa cristalina (HEIM Y OTROS, 1955; MARGOLIASH Y NOVOGRODSKY, 1958) y a hígado de rata produce una inhibición de la actividad del enzima.

El AT también genera una inhibición en preparaciones cristalinas purificadas de catalasa hepática y eritrocítica en presencia de peróxido de hidrógeno. Sin la presencia de peróxido, estos estudios muestran que la inhibición que esta sustancia produce sobre la catalasa es menor y mucho más lenta (HEIM Y OTROS, 1955, 1956; MARGOLIASH Y NOVOGRODSKY, 1958).

En función de lo anterior, se podría afirmar que la presencia de peróxido de hidrógeno es necesaria para la inhibición irreversible de la catalasa por el AT. De hecho, en ausencia de peróxido sólo se consigue una inhibición leve y reversible, y eso, solo después de una incubación prolongada (HEIM Y OTROS, 1956; TEPHLY Y OTROS, 1961; ARAGÓN Y OTROS, 1991a).

Otros estudios muestran que el efecto *in vitro* del AT sobre la actividad de la catalasa es dependiente de la concentración de esta sustancia. Así con dosis de 0.5 M o mayores se inhiben tanto las preparaciones de catalasa cristalina como las de tejido homogenado; en cambio en concentraciones por debajo de 0.5 M, y tras incubación, el AT inhibe la actividad de la catalasa de tejido homogenado pero no de preparaciones de catalasa cristalina (FEINSTEIN Y OTROS, 1958).

En resumen y, a partir de los datos presentados se podría afirmar que el AT es un inhibidor del enzima catalasa *in vitro*, cuyo modo de acción depende de la concentración de éste y de la presencia o no de peróxido de hidrógeno. Así, en ausencia de peróxido de hidrógeno altas concentraciones de AT producen una inhibición reversible del enzima mientras que si el peróxido está presente se produce, mediante la acción del AT, una inhibición rápida e irreversible de la actividad de la catalasa.

### **1.1.3.- Estudios *in vivo*.**

Por su parte, los estudios realizados *in vivo* indican que la administración de AT (1 g/kg) en plantas, produce una disminución en su contenido clorofílico y en la actividad del enzima catalasa. También, se ha observado que esta sustancia genera una inhibición en la catalasa cerebral, renal y hepática, en distintas vías de administración intraperitoneal, intravenosa y oral (HEIM Y OTROS, 1955, 1956; REITZE Y SEITZ, 1985), así como en diversas

especies animales ratas, perros y ratones (HEIM Y OTROS, 1955, 1956; NELSON Y OTROS, 1956; ISHII Y OTROS, 1977a).

Se ha observado también que la inyección de AT causa una reducción en la catalasa hepática, renal y ocular (HEIM Y OTROS, 1955, 1956; FEINSTEIN Y OTROS, 1958; ISHII Y OTROS, 1977a) con distintas dosis de AT (0.25, 0.5, 1 g/kg), diferentes tiempos de incubación (0.5, 3, 6, 12, 24, 48 horas) y en varios tejidos como el cerebral y el hepático, entre otros.

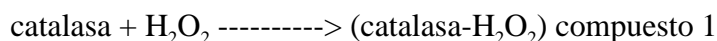
Sin embargo, esta reducción en la actividad de la catalasa no se observa en la catalasa de la sangre (ARAGÓN Y OTROS, 1991a).

A partir de los datos anteriores se podría afirmar también que el AT es un potente inhibidor de la catalasa no solo *in vitro* sino también *in vivo*.

#### **1.1.4.- Mecanismo de inhibición de la catalasa por el AT.**

El mecanismo de inhibición de la actividad de la catalasa por el AT es el siguiente:

La catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reacciona con esta sustancia y se forma un compuesto, llamado compuesto 1 que es espectroscópicamente diferente de la catalasa .



En esta situación, el AT puede unirse con este compuesto 1 y como consecuencia de esto, la actividad enzimática es destruida (MARGOLIASH Y OTROS, 1960; TEPHLY Y OTROS, 1961), es decir, se produce una inhibición irreversible de la catalasa.



Por otra parte, y siguiendo con lo anterior, existen diferentes estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (COHEN Y OTROS, 1983; ARAGÓN Y OTROS, 1991c, 1992a) que ponen de manifiesto una interacción entre el enzima catalasa cerebral y el etanol, lo cual iría en apoyo de la idea de una oxidación central del etanol vía catalasa.

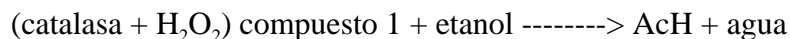
Gaunt y De Duve (1976) pusieron de manifiesto la existencia de catalasa en el cerebro. Este enzima se encuentra en los peroxisomas del citoplasma neuronal (BRANNAN Y OTROS, 1980), donde se metabolizan sustancias resultado de lo cual se produce peróxido de hidrógeno.

### 1.1.5.- Mecanismo de reacción entre el etanol y la catalasa.

El posible mecanismo de reacción entre el etanol y la catalasa sería el siguiente:

La catalasa reaccionaría con una molécula de peróxido de hidrógeno y se formaría una molécula de catalasa activada que se ha llamado compuesto 1.

El compuesto 1 podría reaccionar con el etanol y el resultado de esta reacción sería AcH y agua.



La posibilidad de que esta reacción entre el compuesto 1 y el etanol ocurra en el cerebro está apoyada por varios trabajos. Por una parte, algunos experimentos (ARAGÓN Y OTROS, 1986, 1991c) realizados con inhibidores de la catalasa dependientes del peróxido de hidrógeno como son el AT (HEIM Y OTROS, 1956; TEPHLY Y OTROS, 1961; ARAGÓN Y OTROS, 1991a) y la cianamida (DEMASTER Y OTROS, 1985), ponen de manifiesto que, tanto *in vitro* como *in vivo*, el pretratamiento con etanol previene a la catalasa de la acción inhibitoria de estas sustancias (COHEN Y OTROS, 1980; ARAGÓN Y OTROS, 1991c). Esto sugiere una competición entre el etanol y los inhibidores anteriores por el compuesto 1.

Por otro lado, la generación y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto *in vivo* como *in vitro*, en el cerebro de la rata también ha sido confirmada (ARAGÓN Y OTROS, 1991c). Así, la catalasa y el peróxido de hidrógeno reaccionan para formar el compuesto 1. Cuando este compuesto 1 reacciona con el AT, la cianamida o el 4-hidroxipirazol, la acción de estos inhibidores implica una destrucción irreversible de la actividad de la catalasa cerebral.

Estos aspectos, tomados en conjunto, sugieren que:

- Cuando el etanol esté presente en el organismo competirá con estos inhibidores por el compuesto 1 (catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

- Como consecuencia de esto, la protección de la inhibición de la actividad de la catalasa por el etanol es una prueba indirecta de que el etanol puede estar compitiendo con el inhibidor por el lugar activo del compuesto 1, siendo estos fenómenos dependientes tanto de las dosis de etanol como de las que se utilicen para el inhibidor.

En función de lo anterior, se plantea que el etanol podría ser utilizado como un sustrato de la catalasa cerebral tanto *in vivo* como *in vitro*.

En este sentido, la incubación de homogenados cerebrales (ARAGÓN Y OTROS, 1991c) con etanol supone un aumento en la generación de AcH. Cuando se trató ese medio con metirapona o con pirazol, sustancias que inhiben el citocromo P-450 y el enzima ADH respectivamente, no se obtuvo ninguna modificación en los niveles de AcH obtenidos. Sin embargo, cuando los homogenados cerebrales fueron tratados con AT o cianamida, sustancias que inhiben la actividad de la catalasa, se obtuvieron reducciones significativas del AcH resultante. Además, las reducciones en la producción de AcH fueron dependientes de la dosis de inhibidor utilizada.

Así, diferentes autores (COHEN Y OTROS, 1980; ARAGÓN Y OTROS, 1991c, 1992b; GILL Y OTROS, 1992) han presentado datos que indican que la catalasa cerebral en unión con el peróxido, puede oxidar etanol. En función de esto, por una parte, se ha observado que el pretratamiento a ratas con etanol protegió a la catalasa de la inhibición del AT (COHEN Y OTROS, 1980) o de la cianamida (ARAGÓN Y OTROS, 1991c) y, por otra, se ha visto que la adición al medio de incubación de AT previene la formación de AcH en homogenados cerebrales incubados en presencia de etanol. Estos resultados se explican en función de la competición que AT y etanol presentan por reaccionar con el compuesto 1 (catalasa + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (NICHOLLS, 1962; COHEN Y OTROS, 1980).

Los resultados anteriores se han observado también *in vivo*. Así, los cerebros de ratas pretratadas con inyecciones i.p. de AT (0.0625, 0.25 y 1.0 g/kg) o cianamida (7.15, 14.3 y 28.6 g/kg), evaluadas con etanol (50 y 100 mM) y sacrificadas 9 horas después muestran un

decremento significativo en la oxidación del etanol, que es dependiente de la dosis de inhibidor utilizada (ARAGÓN Y OTROS, 1992a).

Estos datos sugieren que el AcH puede ser directamente formado en tejidos cerebrales y que el responsable de dicha formación sería el enzima catalasa.

En la misma línea, otros estudios han obtenido que la incubación con etanol (50 mmol/l) de homogenados cerebrales de ratones que diferían en la actividad de la catalasa cerebral –ratones normales y ratones acatalasémicos– supone unos niveles de AcH significativamente diferentes para ambas cepas. Esas diferencias apoyan los datos obtenidos en otros estudios en los que la comparación se realizó con ratones pertenecientes a la misma cepa (ARAGÓN Y OTROS, 1992b). En estos trabajos, la incubación con etanol (12.5, 25, 50, 100 y 200 mM) de homogenados cerebrales de ratones normales y acatalasémicos pretratados con AT (0.5 g/kg), produjeron niveles menores de AcH que los producidos por los normales y los controles acatalasémicos.

#### **1.1.6.- Estudios conductuales.**

Estos estudios han puesto de manifiesto que el pretratamiento a ratas con AT previene la depresión motora que es producida por el etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1989), mientras que en ratones lo que se obtiene es una inhibición de la actividad locomotora inducida por dosis moderadas de etanol (1.6 y 2.4 g/kg) (ARAGÓN Y AMIT, 1993). Por otra parte, en relación con otras conductas, también se ha obtenido que el pretratamiento con AT reduce de forma dependiente de la dosis el tiempo de narcosis (TAMPIER Y OTROS, 1988; TAMPIER Y QUINTANILLA, 1991; ARAGÓN Y OTROS, 1991b), la letalidad inducida por el etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1989; 1991b; TAMPIER Y OTROS, 1988) y disminuye la ingesta de etanol en ratas (ARAGÓN Y AMIT, 1992; ROTZINGER Y OTROS, 1994; TAMPIER Y OTROS, 1994) y en ratones (KOECHLING Y AMIT, 1994) que han sido previamente entrenados a beber alcohol, entre otras.

En resumen, los resultados obtenidos en los trabajos de investigación mencionados anteriormente, apoyarían la idea de que la catalasa puede mediar el metabolismo del etanol a nivel central siendo de este modo un importante sistema enzimático que mediante la regulación de la formación de AcH, ejerce una influencia sobre algunas de las conductas inducidas por el etanol.

A continuación se presentan los experimentos realizados para evaluar el efecto de la administración del AT.

## **1.2.- Experimentos.**

### **1.2.1.- Experimento n° 1.**

**Efecto de la administración aguda de 3-amino-1,2,4-triazol (AT) sobre la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.**

#### *Objetivos.*

Los objetivos de este experimento fueron dos, el primero, confirmar el efecto bifásico que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora inducida en ratones en un campo abierto y, el segundo, demostrar la acción inhibitoria del AT sobre la acción locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.

#### *Hipótesis.*

Las hipótesis formuladas en este experimento fueron las siguientes:

1- Teniendo en cuenta los datos obtenidos por diferentes investigaciones, se espera encontrar un efecto antagonista del AT sobre la actividad locomotora inducida por el etanol en ratones.

2- Se plantea que el AT por sí solo, en las dosis empleadas y a los intervalos temporales medidos, no ejercerá ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones.



*Procedimiento experimental.*

Para la realización de este experimento se utilizaron 96 animales, que fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimental o control. Así, cada uno de los grupos estuvo compuesto por 48 ratones divididos en 6 niveles, uno para cada una de las dosis de etanol utilizadas.

Los animales pertenecientes al grupo experimental fueron inyectados i.p. con AT (0.5 g/kg) y situados nuevamente en sus jaulas, 5 horas más tarde, fueron tratados con las diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg) e inmediatamente después fueron situados en el campo abierto para su evaluación.

Por su parte, los animales del grupo control recibieron un pretratamiento con salina y, tras un intervalo de 5 horas, fueron sometidos al mismo tratamiento con etanol que los animales del grupo experimental.

*Resultados.*

La figura 1, recoge los resultados del efecto del pretratamiento con AT o con solución salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (TOOTHAKER, 1991a), en los que el GRUPO y las DOSIS fueron los factores entre sujetos. El factor grupo presentaba dos niveles, AT y salina, mientras que el factor dosis contaba con seis niveles (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, y 4 g/kg de etanol).

El análisis estadístico puso de manifiesto un efecto significativo para los dos factores analizados, el factor GRUPO y el factor DOSIS, así como para la INTERACCIÓN entre ambos.

Los valores de F fueron los siguientes:

Dosis	$F(5,84) = 8.327$	$p < 0.000$
Grupo	$F(1,84) = 12.79$	$p < 0.001$
Interacción	$F(5,84) = 3.135$	$p < 0.012$

Tras esto, se realizaron las pruebas *a posteriori* mediante la prueba de comparaciones múltiples de (*Fisher's Least Significant Difference Test*, LSD) (TOOTHAKER, 1991b) quedando de manifiesto que el etanol produce una respuesta bifásica de excitación y depresión de la actividad locomotora.

Las dosis de etanol que presentaron diferencias significativas fueron:

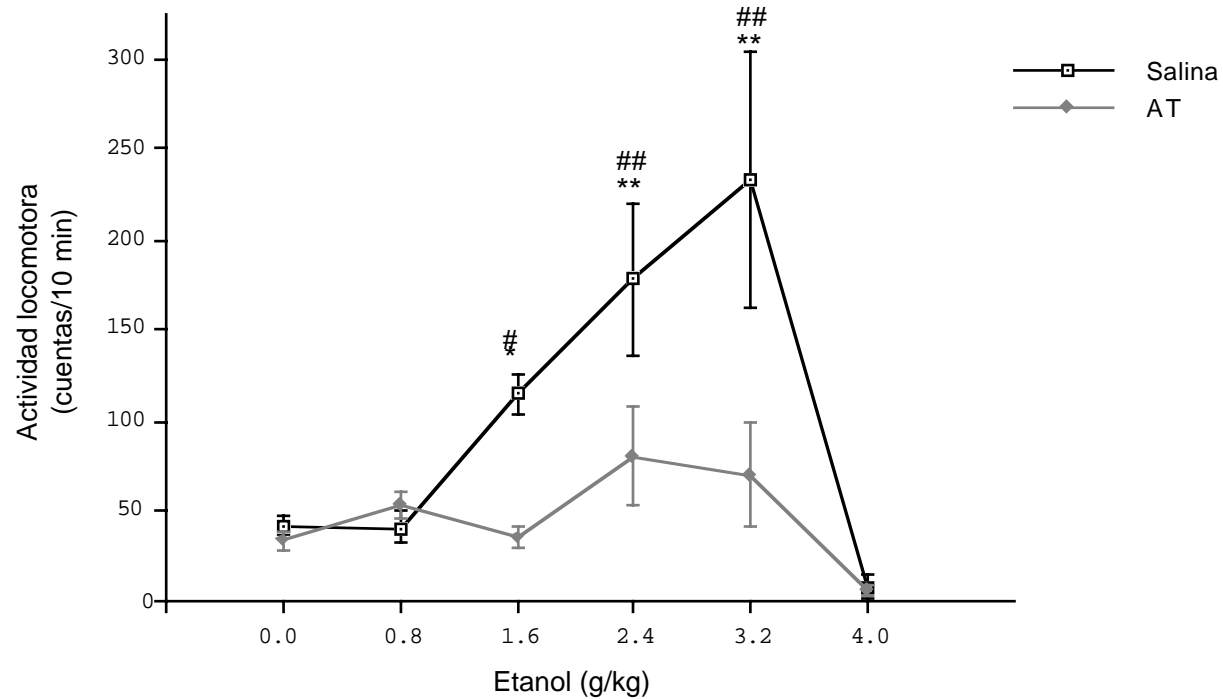
- 0 y 2.4 g/kg.
- 0 y 3.2 g/kg.
- 0.8 y 2.4 g/kg.
- 0.8 y 3.2 g/kg.
- 1.6 y 3.2 g/kg.
- 1.6 y 4 g/kg.
- 2.4 y 4 g/kg.
- 3.2 y 4 g/kg.

A partir de estos resultados, se podría afirmar que existe un efecto sobre la actividad locomotora dependiente de la dosis de etanol utilizada, ya que dosis de etanol moderadas y altas (1.6, 2.4, 3.2 g/kg) inducen un aumento en la actividad locomotora mientras que las dosis elevadas (4 g/kg) tienen un efecto depresivo sobre la misma.

Los datos relativos al grupo experimental indican que no se producen diferencias significativas entre ninguna de las dosis de etanol en su interacción con el AT. De esta forma, la reducción de la actividad que se observa permite la afirmación de que el AT ejerce un efecto depresor sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones.

Para la determinación de diferencias entre las dosis del grupo experimental y el control, se realizó un análisis *a posteriori* que mostró diferencias para las dosis 1.6, 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.

En función de los resultados anteriores se puede afirmar que entre las curvas de actividad locomotora obtenidas existen diferencias estadísticamente significativas.



**Fig. 1:** Efecto de la administración de 3-amino-1,2,4.triazol (AT) o salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con AT (0.5 g/kg) o salina cinco horas antes del tratamiento con diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p< 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-etanol y AT-etanol; ##p< 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol).

### *Discusión.*

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, por una parte, el efecto bifásico que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora de ratones en el campo abierto, obteniendo así una curva bifásica de excitación-depresión y, por otra, la acción antagonista que ejerce el AT sobre esta curva, generando una inhibición de la actividad inducida por el etanol.

Así y, aunque el AT ejerce también su efecto inhibitorio sobre la catalasa hepática (HEIM Y OTROS, 1955; TEPHLY Y OTROS, 1961; NICHOLLS, 1962; REITZE Y SEITZ, 1985), los estudios muestran que el AT no disminuye el metabolismo del etanol en el hígado (ARAGÓN Y OTROS, 1992a). De forma que los resultados obtenidos indicarían una posible implicación del enzima catalasa cerebral en la mediación de esta acción.

En este sentido, se ha observado que en el CAS inducido por etanol, los niveles en sangre de esta sustancia son similares para los animales pretratados con AT y con salina (ARAGÓN Y OTROS, 1985a), lo mismo ocurre en otras conductas inducidas por etanol como actividad locomotora (ARAGÓN Y OTROS, 1989) o narcosis (TAMPIER Y OTROS, 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991b).

Por otra parte, diferentes estudios (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; 1991c) han mostrado la relación entre catalasa y consumo de etanol. Así, se ha obtenido que la actividad de la catalasa cerebral correlaciona positivamente con el consumo voluntario de etanol mientras que para la catalasa hepática solo se ha obtenido un papel moderado tras la administración de dosis narcóticas de etanol, dosis mayores de 3 g/kg. En función de estos resultados, se podría afirmar que la actividad de la catalasa cerebral podría determinar, al menos en parte, los niveles de ingesta de etanol.

También son significativos los resultados obtenidos con diferentes cepas de ratones que ponen de manifiesto que las diferencias observadas en la conducta motora entre, por ejemplo, ratones normales y acatalasémicos, no se pueden atribuir a diferencias en los niveles de etanol porque los niveles sanguíneos de etanol son similares para dosis iguales de etanol (0.8, 1.6, 3.2 g/kg) (ARAGÓN Y OTROS, 1992b). En este sentido, los datos indican que las diferencias observadas no se deben a diferencias en los niveles periféricos de etanol.

Por otra parte, también los datos obtenidos con ratones C57BL/6 y DBA/2 indicarían que las diferencias en cuanto a actividad de la catalasa podría ser uno de los mecanismos que estén mediando la sensibilidad diferencial que presentan ambas cepas de ratones en relación con los efectos del etanol en diferentes conductas (ARAGÓN Y AMIT, 1987). Así, se han obtenido diferencias similares entre estas cepas y ratas tratadas con AT y su grupo control, lo que podría indicar nuevamente la mediación de la catalasa cerebral en las diferencias existentes entre ambas cepas.

Todos estos datos señalarían a la catalasa central como el candidato más probable en la mediación de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

A modo de conclusión, se plantearía que el AT antagoniza el efecto bifásico, inducido por el etanol, generando una depresión de la actividad locomotora inducida por el etanol y que esta acción estaría mediatizada por la acción del sistema enzimático implicado en la formación de AcH, a partir del etanol, liderado por la catalasa cerebral.

### **1.2.2.- Experimento nº 2.**

**El efecto de diferentes dosis de 3-amino-1,2,4-triazol (AT) sobre la actividad locomotora inducida por etanol.**

#### *Objetivos.*

Este experimento se realizó con dos objetivos, por una parte, determinar el efecto que un amplio rango de dosis de AT tuvieran sobre la actividad locomotora espontánea de ratones en un campo abierto y, por otro, determinar si el AT, en alguna de las nuevas dosis utilizadas tiene algún efecto en su interacción con la actividad locomotora inducida por etanol (1.6 g/kg) en ratones.

#### *Hipótesis.*

La hipótesis de este experimento sería la siguiente:

1- La inhibición que el AT produce sobre los efectos del etanol en la actividad locomotora de ratones será dependiente de la dosis de AT utilizada.

### *Procedimiento experimental.*

La realización de este experimento implicó la utilización de 56 ratones CD1, los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos, el experimental y el control. Cada uno de ellos contaba con 7 niveles, uno por cada dosis de AT y cada nivel estaba integrado por 8 animales.

Los animales fueron pretratados con inyecciones i.p. de AT (0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg). La dosis 0 g/kg de AT se obtuvo inyectando al ratón una cantidad de salina equivalente a la de 0.5 g/kg de AT. Tras este pretratamiento los ratones eran devueltos a sus jaulas.

El rango de dosis utilizado se determinó a partir de la dosis de 0.5 g/kg ya que esta dosis anula la inducción de la actividad locomotora producida por etanol. Esta dosis de AT ha sido utilizada por diferentes autores (ARAGÓN Y OTROS, 1989; ARAGÓN Y AMIT, 1993) en la evaluación de la acción del AT sobre la acción de etanol en diferentes conductas. El abanico de dosis es el resultado de una progresión geométrica de la dosis de 0.5 g/kg como última dosis.

Tras un intervalo de 5 horas, los ratones recibían el tratamiento, consistente en una inyección i.p. de salina, si pertenecían al grupo control, y en una inyección de etanol (1.6 g/kg), si formaban parte del grupo experimental.

Inmediatamente después de esta última inyección, el animal era situado en el aparato de campo abierto para su posterior evaluación conductual.

El protocolo temporal, de 5 horas, entre el pretratamiento y el tratamiento posterior, fue establecido a partir de algunos trabajos (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1991c) que ponen de manifiesto que este es el intervalo de máxima inhibición de la actividad de la catalasa cerebral (82-90%) por parte del AT.

### *Resultados.*

En la figura 2 se pueden observar, por una parte, el efecto que las diferentes dosis de AT presentan sobre la actividad locomotora espontánea y, por otra, la acción del AT sobre la actividad locomotora inducida por una dosis de etanol.

La prueba estadística utilizada fue un ANOVA de los grupos experimental y control.

Así, se realizó un ANOVA de 2 factores, estos fueron, el factor GRUPO, que constaba de dos niveles, –etanol y salina–, y el factor DOSIS con 7 niveles –0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg de AT–.

El análisis realizado puso de manifiesto un efecto estadísticamente significativo para los dos factores, el factor GRUPO y el factor DOSIS, así como para la INTERACCIÓN entre ambos.

Los valores que se obtuvieron para la F, fueron los siguientes:

Dosis	F (6,98)= 3.825	p< 0.002
Grupo	F (1,98)= 21.759	p< 0.000
Interacción	F (6,98)= 3.095	p< 0.008

Como puede observarse en la figura 2, los animales que habían sido tratados con solución salina no presentaron diferencias significativas. Este resultado indica que el AT en cualquiera de las dosis utilizadas en este experimento no tiene un efecto significativo sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones.

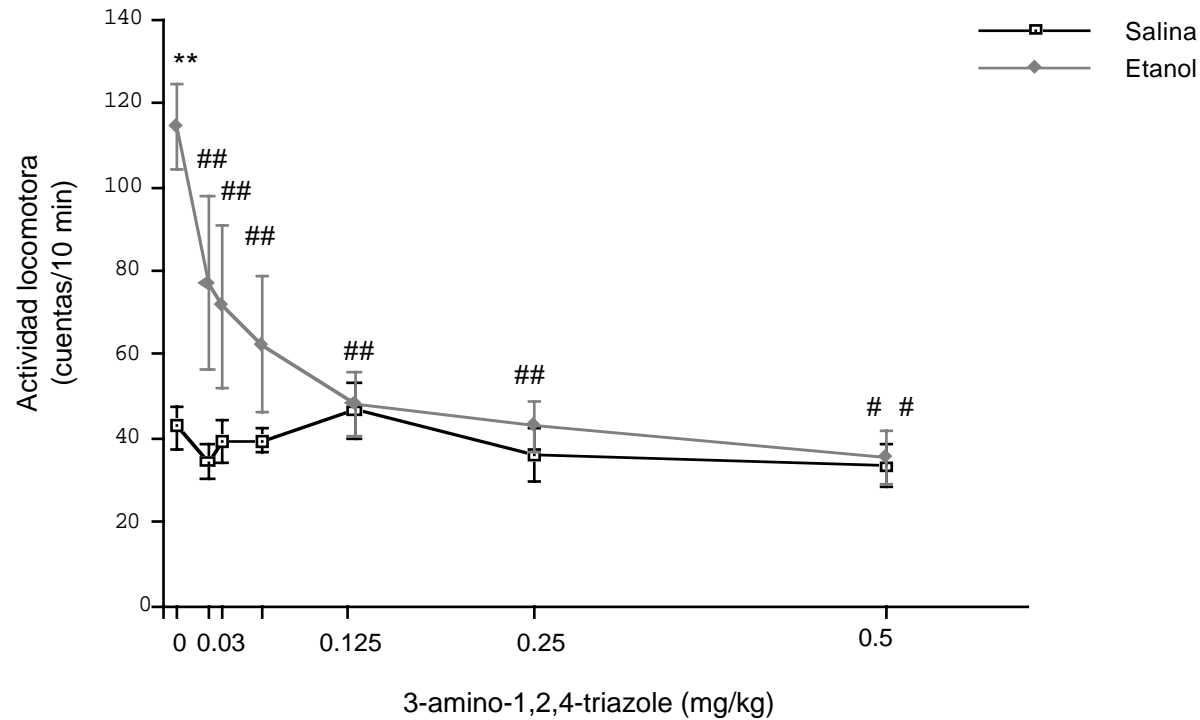
El análisis *a posteriori* realizado para el grupo experimental, mediante la prueba LSD de Fisher, mostró diferencias estadísticamente significativas entre las siguientes dosis:

- 0 y 0.01 g/kg
- 0 y 0.03 g/kg
- 0 y 0.06 g/kg
- 0 y 0.125 g/kg
- 0 y 0.25 g/kg
- 0 y 0.5 g/kg
- 0.01 y 0.125 g/kg
- 0.01 y 0.25 g/kg
- 0.01 y 0.5 g/kg
- 0.03 y 0.5 g/kg



Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto del AT sobre la actividad locomotora inducida por etanol es dependiente de la dosis de inhibidor administrada. Así, las mayores dosis de AT inhiben en mayor grado la actividad locomotora que las dosis más pequeñas.

En cuanto a la interacción entre los grupos, el análisis *a posteriori*, indica que existen diferencias significativas para las dosis bajas del inhibidor (0.01 y 0.03 g/kg) mientras que en las dosis moderadas (0.06 y 0.125 g/kg) y altas (0.25 y 0.5 g/kg) no se obtienen diferencias entre ambos grupos.



**Fig. 2:** Efecto de diferentes dosis de 3-amino-1,2,4-triazol (AT) sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con AT (0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 g/kg) o salina cinco horas antes del tratamiento con etanol (1.6 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\* $p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos salina-AT y salina-etanol; ## $p < 0.01$  para las diferencias entre el grupo salina-etanol y el grupo AT-etanol).

### *Discusión.*

En este experimento se ha estudiado el efecto de diferentes dosis de AT sobre la actividad locomotora espontánea de ratones, así como el efecto de estas dosis sobre la actividad inducida por etanol en un campo abierto.

En ese sentido, los resultados ponen de manifiesto que el AT, a ninguna de las dosis evaluadas, presenta, por sí mismo, efecto sobre la actividad locomotora espontánea. Desde un planteamiento estadístico, este hecho se puede observar, a partir de los análisis *a posteriori*, en la ausencia de diferencias entre la actividad de los ratones pretratados con la dosis 0 g/kg de AT y las restantes dosis del inhibidor. Este hecho es congruente con los datos que indican que el tratamiento con AT es tóxico en administraciones crónicas pero que muestran una ausencia de toxicidad si la administración es aguda (WEIR Y OTROS, 1958; ALEXANDER, 1959; GAINES Y OTROS, 1973; HUNT, 1996). Además, otros autores han informado de la ausencia de efecto del AT sobre la deambulación espontánea de ratas (ARAGÓN Y OTROS, 1989) y de ratones (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

En cuanto a los resultados obtenidos en el grupo experimental, se puede afirmar que el AT ejerce un efecto inhibitorio, sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones. En relación con este hecho, se obtienen diferencias entre las dosis menores de AT y las restantes dosis.

Además, se ha obtenido que esta inhibición es dependiente de la dosis de inhibidor utilizada. De modo que se observa una mayor inhibición de la actividad locomotora a medida que se aumentan las dosis del AT. Así, este efecto dependiente de la dosis se determina observando que los datos de la interacción entre los grupos solo muestran diferencias significativas para las dosis 0, 0.01 y 0.03 g/kg de AT, que son las dosis menores de AT, mientras que entre las dosis restantes ya no se obtienen diferencias entre el grupo control y el experimental.

Así mismo, los resultados obtenidos en este experimento están en consonancia con los de estudios anteriores (ARAGÓN Y OTROS, 1992a) en los que se observó que en ratas pretratadas con una dosis de AT (1 g/kg), esta sustancia bloqueó, atenuó y antagonizó diferentes efectos conductuales inducidos por etanol como el CAS (ARAGÓN Y OTROS, 1985a), la actividad locomotora (ARAGÓN Y OTROS, 1989), la narcosis o la letalidad (ARAGÓN Y AMIT, 1987; TAMPIER Y OTROS, 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991b).

El resultado que indica que la relación entre etanol y AT es dependiente de las dosis de AT también tiene referentes anteriores, en este sentido, los resultados de los estudios sobre consumo de etanol ponen de manifiesto que el AT produce una reducción de la ingesta voluntaria de etanol, que es dependiente de la dosis de AT administrada, tanto en ratas (ARAGÓN Y AMIT, 1992; ROTZINGER Y OTROS, 1994; TAMPIER Y OTROS, 1995) como en ratones (KOECHLING Y AMIT, 1994). Este efecto dependiente de la dosis de AT se ha observado también en la reducción que ejerce el AT sobre la actividad de la catalasa cerebral (ARAGÓN Y OTROS, 1991c).

Por otra parte, las acciones que ejerce el AT parecen ser específicas para el etanol ya que este inhibidor no atenúa los efectos conductuales producidos por otras drogas como la morfina y el cloruro de litio (ARAGÓN Y OTROS, 1985a), el pentobarbital (QUINTANILLA Y OTROS, 1980; TAMPIER Y OTROS, 1988) y la morfina (ARAGÓN Y AMIT, 1993) entre otras.

En resumen, se podría afirmar que el pretratamiento con AT antagoniza, en función de la dosis administrada, los efectos psicomotores del etanol sobre la actividad locomotora en ratones.

### **1.2.3.- Experimento nº 3.**

#### **El efecto del intervalo temporal entre la administración del 3-amino-1,2,4-triazol (AT) y el etanol.**

##### *Objetivos.*

El objetivo que se seguía con la realización de este experimento fue determinar el intervalo temporal durante el que el AT ejercería su acción sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

##### *Hipótesis.*

1- Los efectos del AT sobre la actividad locomotora inducida por el etanol en ratones, serán función del intervalo de tiempo que transcurre entre la administración de inyecciones i.p. de AT y la posterior evaluación con etanol.

2- A partir de un intervalo de tiempo determinado la acción del AT empezará a declinar hasta la recuperación de los niveles basales de la actividad locomotora.

*Procedimiento experimental.*

Para la realización de este experimento se utilizaron 40 animales que fueron asignados aleatoriamente a los diferentes intervalos temporales que se iban a evaluar, resultando cinco intervalos temporales con ocho ratones por intervalo.

Los animales fueron pretratados con AT (0.5 g/kg) y tras intervalos temporales diferentes (0, 2.5, 5, 10 y 20 horas) fueron administrados con una inyección i.p. de etanol (1.6 g/kg). Tras esta, el animal era situado inmediatamente después en el campo abierto.

*Resultados.*

En la figura 3 se presenta el efecto de los diferentes intervalos temporales, entre la administración de AT (0.5 g/kg) y el etanol (1.6 g/kg), sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante un ANOVA de 1 factor. El factor analizado fue el efecto TIEMPO, que presentaba cinco niveles (0, 2.5, 5, 10 y 20 horas).

Los resultados indicaron un efecto estadísticamente significativo para el efecto TIEMPO.

El valor obtenido para la F fue el siguiente:

Tiempo	$F(4,35) = 3.021$	$p < 0.031$
--------	-------------------	-------------

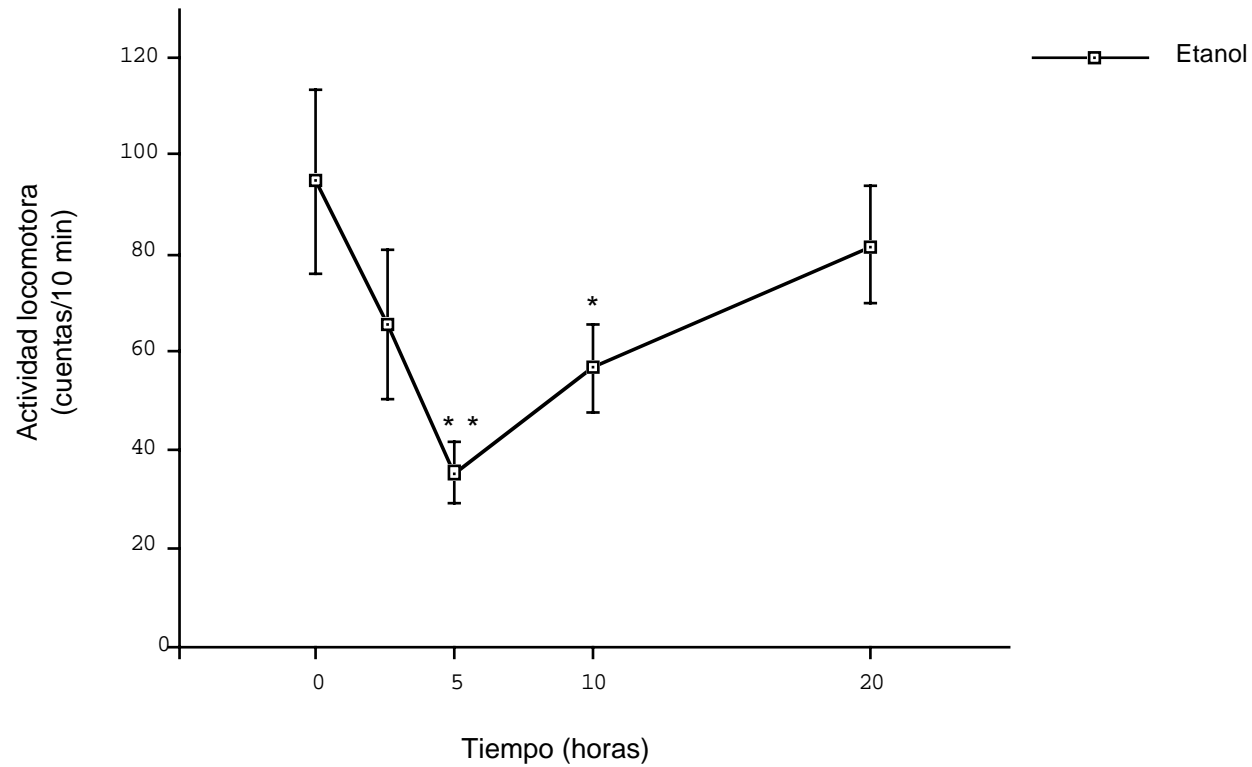
Para determinar entre qué intervalos temporales existían diferencias significativas, se realizó un análisis *a posteriori* mediante la prueba LDS de Fisher.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de diferencias entre los siguientes intervalos:

- 0 y 5 horas.
- 0 y 10 horas.
- 5 y 20 horas.

Como se puede observar en la figura 3, el pretratamiento con AT produce una inhibición dependiente de la actividad locomotora, inducida por etanol, que alcanza su punto máximo a las 5 horas de su inyección y se mantiene cuando el intervalo entre ambas drogas es de 10 horas.

Además, se puede observar también que a partir de dicho momento se produce una recuperación de la actividad (20 horas) que es similar a los niveles basales. Este resultado se extrae de la ausencia de diferencias significativas entre los tiempos 0 y 20 horas.



**Fig. 3:** Efecto del curso temporal del 3-amino-1,2,4-triazole (AT) sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados con AT (0.5 g/kg) o salina simultáneamente, o 2.5, 5, 10 o 20 horas antes del tratamiento con etanol (1.6 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05)

### *Discusión.*

La evaluación del intervalo temporal entre el pretratamiento con AT y el posterior tratamiento con etanol ha puesto de manifiesto que para que el AT ejerza su máxima acción sobre la actividad locomotora, el intervalo óptimo entre los tratamientos es el de cinco horas. Este dato es congruente con los obtenidos por otros autores que muestran que la máxima inhibición de la catalasa cerebral por la acción del AT se obtuvo cinco horas después de la administración de esta sustancia (ARAGÓN Y OTROS, 1985a, 1989, 1991c).

En este sentido, se ha obtenido (ARAGÓN Y OTROS, 1989) un decremento del 85-95% en la actividad de la catalasa cerebral, tanto en ratas como en ratones, respecto al grupo tratado con salina cuatro horas después de la inyección i.p. de AT (0.5 y 1 g/kg).

Además, los resultados referidos a otros inhibidores de la catalasa como, por ejemplo, la cianamida (SANCHIS-SEGURA, 1997) indican también que la máxima inhibición de la actividad del enzima (50%) se produce cinco horas después de la administración del inhibidor generando también en ese momento la máxima inhibición de la actividad locomotora.

Por otra parte, la diferencia encontrada entre la actividad locomotora para los tiempos 0 y 10 horas indicaría que la acción del AT permanece, al menos, después de diez horas de haber sido administrado el inhibidor. Y es a partir de ese momento cuando los niveles de actividad enzimática empiezan a recuperarse hasta alcanzar el intervalo de 20 horas en el que ya la actividad locomotora está totalmente recuperada no mostrando diferencias con los valores basales.

En este sentido, los datos de este experimento van en la línea de los obtenidos para otros inhibidores. Así, los resultados obtenidos para la cianamida, indican también que esta retorna a los valores control 24 horas después del tratamiento con el inhibidor (DEMASTER Y OTROS, 1986).

En definitiva, la manipulación del intervalo temporal (0, 2.5, 5, 10 y 20 horas) entre el pretratamiento de los ratones con AT (0.5 g/kg) y la administración del etanol (1.6 g/kg), indica que el AT produce una inhibición sobre la actividad locomotora inducida por etanol. La inhibición inducida por el AT es máxima a las 5 horas de su inyección. A partir



de ese momento, comienza una recuperación de la actividad locomotora hasta los niveles basales de la variable.

#### **1.2.4.- Experimento n° 4.**

##### **El efecto de la administración aguda de 3-amino-1,2,4-triazol (AT) sobre la actividad de la catalasa encefálica en diferentes intervalos temporales.**

Aunque la presentación de este experimento está realizada como si se tratara de un único estudio, en su desarrollo realmente engloba dos estudios. Por una parte estaría la evaluación del efecto de la administración de diferentes dosis de AT sobre la actividad de la catalasa cerebral y, por otra, se examina el efecto de diferentes intervalos temporales entre la administración de una única dosis de AT y la medida de la actividad de la catalasa encefálica sobre la mencionada actividad.

La presentación conjunta responde al hecho de que de este modo su enfoque y su objetivo estén sujetos a una mayor comprensión durante su exposición.

##### *Objetivos.*

Los objetivos de este experimento fueron varios, por una parte, determinar el efecto de diferentes dosis de AT sobre la actividad de la catalasa cerebral, por otra, determinar el efecto de varios intervalos temporales entre la administración de AT y la medida de la actividad de la catalasa cerebral y, finalmente, evaluar la posible relación entre la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de este enzima.

##### *Hipótesis.*

Las hipótesis formuladas en este experimento fueron las siguientes:

1- La administración de diferentes dosis de AT producirá una reducción de la actividad de la catalasa que será dependiente de la dosis de AT administrada.

2- El tratamiento con AT provocará una pérdida de la actividad de la catalasa que se recuperará tras un intervalo temporal determinado.

3- La acción del AT sobre la actividad locomotora y sobre la acción de la catalasa cerebral presentarán una estrecha relación.

*Procedimiento experimental.*

Para la realización de estos estudios bioquímicos se utilizaron 72 animales. De estos, 42 fueron utilizados para evaluar la influencia de las diferentes dosis de AT sobre la actividad de la catalasa cerebral. Los 30 restantes se emplearon para determinar el efecto del intervalo temporal entre la administración de una dosis aguda de AT (0.5 g/kg) en la actividad del mencionado enzima.

En el primer caso, los animales eran pretratados i.p. con diferentes dosis de AT (0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg) y tras un intervalo de 5 horas, eran anestesiados y perfundidos para posteriormente extraer su cerebro.

En el segundo caso, se aplicó un tratamiento con una dosis de AT (0.5 g/kg) y en diferentes intervalos temporales (0, 2.5, 5, 10, 20 horas) se anestesiaba y perfundía a los animales para la posterior extracción de su cerebro.

En ambos casos, los animales eran anestesiados con ketamina (0.5 ml de la solución estándar) y tras la extracción de los cerebros estos eran inmediatamente conservados a -80 C hasta el momento de su utilización.

*Resultados.*

A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos.

En la tabla 1 se muestra la actividad de la catalasa cerebral de ratones tratados con varias dosis de AT cinco horas antes de realizar la perfusión de estos animales.

Se realizó un ANOVA de un factor. El factor analizado fue el efecto DOSIS, que presentaba 7 niveles (0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg).

Los resultado indicaron un efecto estadísticamente significativo para el efecto DOSIS.

El valor obtenido para la F fue el siguiente:

Dosis	$F(6,33) = 3.19$	$p < 0.01$
-------	------------------	------------

Para determinar entre qué dosis existían diferencias significativas, se realizó un análisis *a posteriori* mediante la prueba LDS de Fisher.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de diferencias entre el grupo tratado con salina y las dosis siguientes: 0.01, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg.

Estos resultados indicarían que las dosis utilizadas producen una reducción de la actividad de la catalasa cerebral.

Por otra parte, los datos obtenidos para el segundo aspecto a evaluar que se recoge en este experimento, la influencia del intervalo temporal entre el pretratamiento con AT (0.5 g/kg) y la recogida de las muestras, pueden observarse en la tabla 2.

La prueba estadística para analizar los resultados obtenidos fue un ANOVA de un factor. Este factor fue el efecto TIEMPO, que presentaba 5 niveles (0, 2.5, 5, 10 y 20 horas).

Los resultados indicaron un efecto estadísticamente significativo para el mencionado efecto.

El valor obtenido para la F fue el siguiente:

Tiempo	$F(4,22) = 3.53$	$p < 0.05$
--------	------------------	------------

Con objeto de determinar entre qué intervalos existían diferencias significativas, se realizó un análisis *a posteriori* mediante la prueba LDS de Fisher.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que es el intervalo de 5 horas el que produce la mayor inhibición de la actividad del enzima. Al mismo tiempo estos resultados indican que la actividad de la catalasa cerebral volvió a los niveles basales de los animales tratados con salina a las 20 horas.

Posteriormente, mediante un estudio correlacional, se analizó la relación entre la actividad de la catalasa cerebral de animales sin experiencia previa con etanol que fueron tratados con AT (tablas 1 y 2) y la actividad locomotora inducida por etanol en ratones pretratados también con AT (experimento n° 2). Los resultados de este análisis se recogen en la figura 4.

Para la correlación se compararon los datos de los estudios del efecto de varias dosis de AT y los efectos del intervalo temporal sobre la actividad de la catalasa cerebral con los datos de los experimentos sobre los efectos de varias dosis de AT y los efectos del intervalo temporal sobre la actividad locomotora inducida por etanol. La covarianza que se obtiene para ambas medidas da como resultado un valor para la correlación de Pearson significativo,  $r^2 = 0.78$  ( $p < 0.01$ ).

En función de los resultados obtenidos se puede afirmar que a mayor actividad de la catalasa cerebral se da también una mayor actividad locomotora inducida por etanol.

TABLA 1

## EFECTO DE DOSIS DE AT SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL

Dosis de AT (g/kg)	Actividad de la catalasa cerebral (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteína)	p <
0.000	1.870±0.096	ns
0.010	1.527±0.207	0.05
0.030	1.722±0.080	ns
0.060	1.534±0.039	0.05
0.125	1.470±0.078	0.05
0.250	1.309±0.061	0.01
0.500	1.353±0.077	0.01

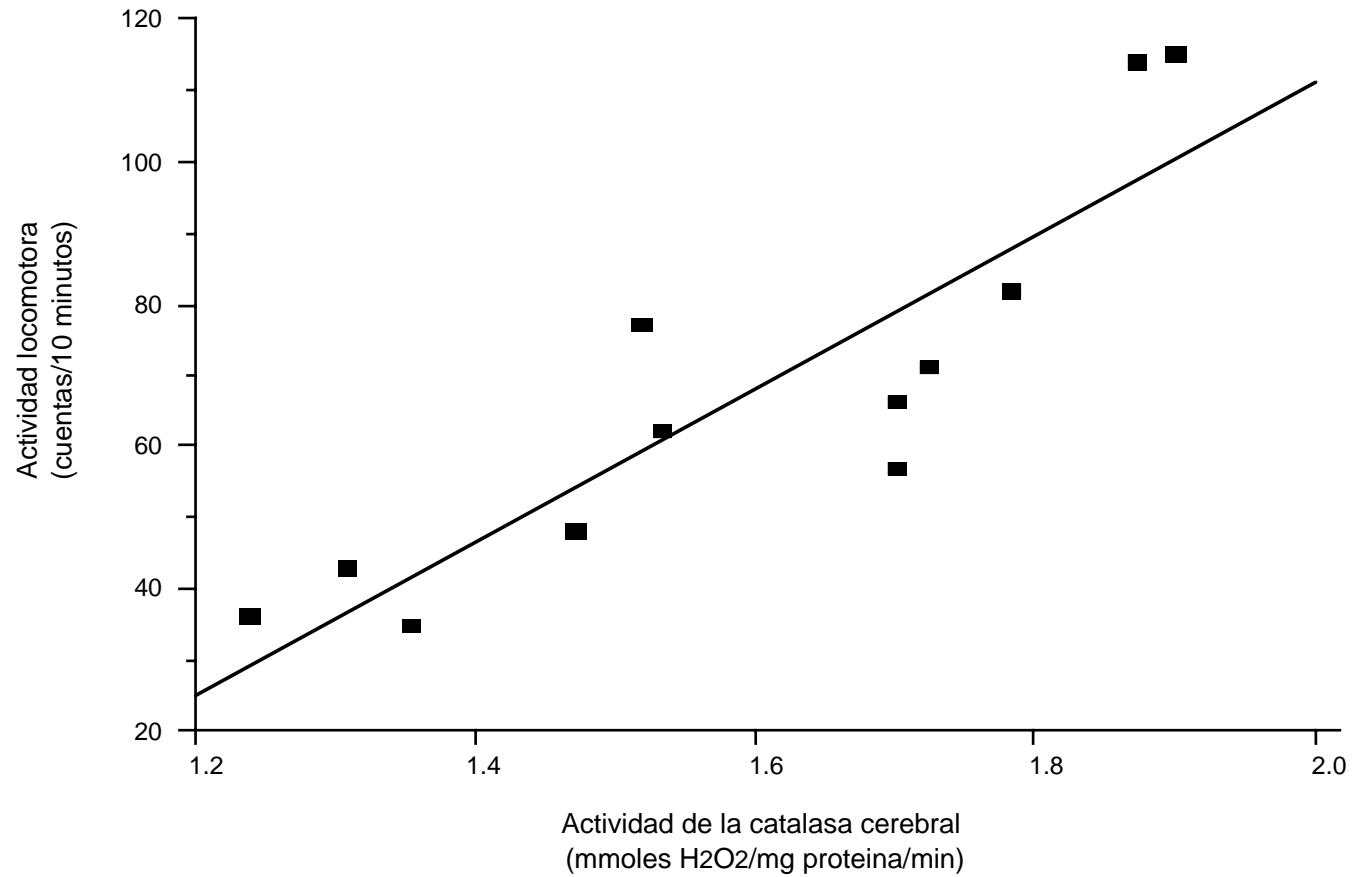
Medias y errores estándar de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) tras la administración i.p. de varias dosis de AT (g/kg) en ratones (n = 6 por grupo), 5 horas después de la inyección de AT.

TABLA 2

CURSO TEMPORAL DEL EFECTO DEL AT SOBRE  
LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA CEREBRAL

Tiempo (horas)	Actividad de la catalasa cerebral (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteína)	p <
0	1.900±0.210	ns
2.5	1.750±0.112	ns
5	1.240±0.092	0.01
10	1.700±0.194	ns
20	1.783±0.091	ns

Medias y errores estándar de la actividad de la catalasa cerebral (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg proteína) en diferentes intervalos temporales tras la administración i.p. de AT (0.500 g/kg) en ratones (n = 6 por grupo).



**Fig. 4:** Relación entre la actividad de la catalasa cerebral y la actividad locomotora inducida por etanol de grupos con las mismas condiciones de tratamiento. El eje horizontal indica la actividad de la catalasa cerebral (mmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg proteina/min) para cada grupo (Tablas 1 y 2). El eje vertical muestra la actividad inducida por etanol para diferentes animales pero bajo las mismas condiciones de tratamiento.





### *Discusión.*

Como se ha presentado, los resultados obtenidos indican una correlación significativa entre la actividad locomotora inducida por etanol y la actividad de la catalasa encefálica. Además, esta relación se ha demostrado con diferentes dosis de AT y en diversos intervalos temporales tras el tratamiento con AT.

Los resultados obtenidos replican algunos de los obtenidos en la literatura. En este sentido, se informó de que 20 horas después de la inyección de AT la actividad de la catalasa cerebral volvía a sus valores normales (DEMASTER Y OTROS, 1986; ARAGÓN Y OTROS, 1991a). Los datos obtenidos en el presente experimento demuestran lo mismo ya que la inhibición que el AT ejerce sobre la actividad locomotora así como los obtenidos para la actividad de la catalasa ponen de manifiesto que ambos parámetros retornan a sus valores basales a las 20 horas de la administración del AT.

Por otra parte, el curso temporal que se observa en la reducción de la catalasa cerebral es similar al obtenido con otros inhibidores de la catalasa como la cianamida. Así, se encontró que la cianamida (0.68 mmoles/kg) también produce la máxima inhibición de la actividad de la catalasa a las 5 horas de su administración (SANCHIS-SEGURA, 1997).

Otros resultados indican que el AT inhibe también la catalasa hepática (HEIM Y OTROS, 1955; REITZE Y SEITZ, 1985). Sin embargo, investigaciones posteriores no han encontrado cambios en los niveles de etanol en sangre tras la administración de AT y dosis moderadas etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1985a, 1989). Por otra parte, otros datos indican que solo cuando la dosis de etanol que se administra es mayor de 3 g/kg la catalasa hepática tendría relevancia en el metabolismo del etanol (TAMPIER Y MARDONES, 1986; ARAGÓN Y OTROS, 1991b).

Una explicación alternativa podría ser que el AT, mediante la inhibición que genera sobre la actividad de la catalasa, previene la formación de AcH en el cerebro, impidiendo cualquier efecto conductual por parte del AcH (SMITH Y OTROS, 1997; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997). Los datos que apoyan este planteamiento provienen de los resultados que demuestran una reducción de la concentración de AcH en homogenados cerebrales incubados con AT (ARAGÓN Y OTROS, 1992a; ARAGÓN Y AMIT, 1993).

Por otra parte, aunque los homogenados cerebrales de ratones pertenecientes a la cepa C3H (C3H-N y C3H-A) incubados con etanol muestran generación de AcH, los ratones acatalasémicos (C3H-A) mostraron un aumento irrelevante en la producción de AcH cuando los homogenados se trataron con concentraciones de etanol mayores. Este resultado es congruente con sus bajos niveles de actividad de la catalasa (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

Así, la reducción de la actividad de la catalasa, ya sea mediante la acción del AT o por una selección genética, supone una disminución tanto en los niveles generados de AcH como en la actividad locomotora inducida por etanol.

Además, también se ha obtenido (ARAGÓN Y AMIT, 1993) que el efecto conductual del AT es específico para el etanol ya que no altera la actividad locomotora inducida por cocaína.

En función de estos datos se plantea, por una parte que el AT inhibe la actividad locomotora inducida por etanol y, por otra, que esta misma sustancia provoca también una inhibición sobre la actividad de la catalasa cerebral a las mismas dosis e intervalos temporales. Y, dado que estos dos parámetros presentan una relación estadísticamente significativa y positiva parece posible afirmar que la catalasa encefálica desempeñaría una importante función en la mediación en algunos de los efectos inducidos por etanol, en este caso, sobre la actividad locomotora inducida por esta droga.

A continuación se presentan las conclusiones que se extraen de la fase experimental que conforman los experimentos realizados con AT.

### 1.3.- Conclusiones.

1- El etanol produce un efecto en la actividad locomotora de ratones que es dependiente de la dosis de etanol utilizada.

Los datos obtenidos demuestran que en los animales pretratados con salina y evaluados con etanol, dosis bajas de etanol inducen la actividad locomotora, mientras que, dosis altas de etanol inhiben la mencionada actividad.

2- El AT (0.5 g/kg) posee un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones.

3- La administración de AT solo no afecta la actividad locomotora espontánea de los ratones.

4- La inhibición que el AT ejerce sobre la actividad locomotora inducida por etanol, es dependiente de la dosis de AT administrada. En este sentido, las dosis bajas de AT (0, 0.01, 0.03, 0.06 g/kg) en su interacción con etanol (1.6 g/kg), no disminuyen la actividad locomotora inducida por etanol. Sin embargo, sí se observa esa disminución sobre los efectos del etanol en la actividad locomotora con dosis altas de AT (0.125, 0.25 y 0.5 g/kg).

5- Sólo cuando el intervalo de tiempo entre el pretratamiento con AT y la administración de etanol sea de cinco horas o su valor esté próximo a cinco horas, los efectos del AT sobre la actividad locomotora inducida por etanol serán máximos.

6- La acción inhibitoria que el AT ejerce sobre la actividad locomotora inducida por etanol es máxima a las 5 horas de su inyección y, a partir de ese momento se recupera hasta los niveles basales de la variable.

7- El AT produce una reducción de la actividad de la catalasa cerebral.

8- Existe una correlación elevada y positiva entre los efectos del AT sobre la actividad locomotora inducida por etanol y la inhibición que esta sustancia ejerce sobre la actividad de la catalasa encefálica, resultado que reafirma el planteamiento de que este enzima está implicado en el mecanismo que media esta acción conductual del etanol.

## **2.- Fase II: Efecto de la administración de 4-MP.**

A continuación se presenta una breve introducción acerca de la utilización del 4-MP en diferentes planteamientos experimentales, que engloban tanto paradigmas bioquímicos como conductuales, en los que se pone de manifiesto su acción inhibitoria sobre la actividad de la ADH periférica. La presencia de esta inhibición es un aspecto determinante en los experimentos que componen la parte experimental de esta Tesis Doctoral ya que esta acción del 4-MP sobre la ADH permite una atenuación transitoria de los efectos periféricos originados por el aumento en la concentración de AcH periférico, estando esta generada por la acción de los diferentes inhibidores utilizados en los experimentos. Esta manipulación farmacológica mediante el 4-MP, permite la expresión observable de las posibles acciones existentes a nivel central producidas por la acumulación central de AcH.

### **2.1.- Introducción teórica: Aspectos generales.**

El 4-MP es una sustancia que actúa específica y eficazmente como inhibidor de la ADH (THEORELL Y OTROS, 1969; BLOMSTRAND Y THEORELL, 1970) generando, tras la ingesta de etanol, un bloqueo completo de la acumulación de AcH.

Como ya se ha comentado el 4-MP previene la acumulación de AcH durante el metabolismo del etanol (LINDROS, 1975; SALASPURO Y OTROS, 1977; LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981). En este sentido, la inhibición parcial causada por el 4-MP sobre la oxidación del etanol podría permitir que casi todo el AcH que se obtiene tras la oxidación del etanol fuera metabolizado dentro del hígado, eliminando de esta forma la acumulación de AcH en sangre (LINDROS, 1975).

El estudio de las propiedades del 4-MP como un inhibidor *in vivo* del metabolismo del etanol en ratas ha puesto de manifiesto que esta sustancia ejerce una inhibición competitiva con el metabolismo del etanol prolongando la eliminación de esta droga (BLOMSTRAND Y THEORELL, 1970; BLOMSTRAND, 1971; RYDBERG Y NERI, 1972; SALASPURO Y OTROS, 1977). Así, la administración del 4-MP 15 minutos antes del etanol (1.5 g/kg) induce una inhibición de la eliminación del etanol que es dosis dependiente, de forma que mayores dosis de 4-MP producen un grado de inhibición también mayor.

Por otra parte, en relación a la duración del efecto inhibitorio que el 4-MP ejerce sobre la eliminación del etanol, se ha observado que cuanto mayor es el intervalo entre la administración de las dos sustancias menor es el grado de inhibición que ejerce el 4-MP en la eliminación del etanol, sirvan como ejemplo los datos siguientes, un intervalo de 0.25 horas generó un 67% de inhibición; el transcurso de una hora entre las administraciones de las dos sustancias produjo una inhibición del 61%; 2 horas un 46%; 4 horas un 14% (RYDBERG Y NERI, 1972).

Entre otras acciones, el 4-MP ejerce una disminución en los efectos metabólicos secundarios del etanol relacionados con el cambio en la reducción del estado redox hepático de la ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  libres (SALASPURO Y OTROS, 1977).

Otros estudios (RYDBERG Y NERI, 1972) han intentado determinar si el 4-MP tiene algún efecto depresor central o si modifica los efectos inducidos por etanol sobre el SNC, al mismo tiempo también se estudió la posible correlación entre la concentración de etanol en la sangre y las alteraciones conductuales observadas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las alteraciones en la coordinación provocadas por la administración de etanol solo son del 11.9%, siendo para el 4-MP del 7.2% mientras que la combinación de ambos provocaron alteraciones del 14.9%.

Estos datos indicarían que el 4-MP induce por sí mismo una depresión conductual y además, que actúa sinérgicamente con el etanol, produciendo un aumento y una prolongación de las alteraciones inducidas por el etanol en la coordinación motora.

Sin embargo, los resultados obtenidos en lo referido a la acción del 4-MP en la actividad motora son contradictorios ya que mientras unos autores (RYDBERG Y NERI, 1972) informan del aumento y prolongación de la incoordinación motora inducida por etanol, otros autores obtienen que la administración de esta sustancia no tiene una acción farmacológica directa sobre la depresión conductual ya que no altera el desempeño motor inducido por etanol (1,5 g/kg i.p.) en el plano inclinado (SINCLAIR Y OTROS, 1980) ni la actividad locomotora espontánea de ratas (SPIVAK Y AMIT, 1987). Estos resultados son consistentes con lo obtenido por Svensson y Waldeck (1973) utilizando ratones en un paradigma de campo abierto.

Esta sustancia se ha utilizado también en estudios sobre ingesta de etanol en combinación con inhibidores de la ALDH para determinar, por una parte, su papel en la conducta de ingesta mediante su acción indirecta sobre los niveles de AcH en sangre y, por otra, permite la evaluación de si los niveles de AcH por sí mismos limitan directamente el consumo de alcohol.

Así, se ha obtenido que en interacción con la cianamida, un inhibidor de la ALDH, provoca una disminución de los niveles de AcH aumentados por la inhibición de la ALDH inducida por la cianamida, pero no provoca un aumento del consumo voluntario de etanol en ratas (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y LINDROS, 1981). Estudios realizados por estos mismos autores con ratas de la cepa ANA, que tienen bajo consumo de etanol y que desarrollan elevados niveles de AcH tras la ingesta de etanol (ERIKSSON, 1973), indican también que los bajos niveles de AcH obtenidos con la administración de 4-MP a estas ratas no suponen un aumento en la ingesta de alcohol. En esta línea de investigación, también se ha obtenido que el 4-MP (30 mg/kg i.p.), produce una profunda supresión de la ingesta voluntaria de etanol sin producir efectos colaterales o tóxicos observables que pudieran dar cuenta de la supresión en la ingesta voluntaria (CARR Y OTROS, 1980). Este hecho se ha intentado explicar desde dos puntos de vista. Por una parte, se ha planteado que al generarse un retraso en la eliminación de etanol, este se encuentra durante más tiempo disponible lo que reduciría el requerimiento de etanol, por lo que el animal reduciría su consumo de etanol; por otra parte, la reducción en el consumo podría deberse a la eliminación de las consecuencias reforzantes producidas por el AcH en el cerebro (BROWN Y OTROS, 1979) debidas a la inhibición de la formación de AcH por el 4-MP generando así una pérdida en la preferencia del etanol.

También, los datos obtenidos en estudios con humanos indican nuevamente la acción inhibitoria del 4-MP sobre la ADH. En este sentido, la administración intravenosa de 4-MP (5-7 mg/kg) 30 minutos antes del etanol, disminuyó rápidamente la acumulación de AcH producida tras la ingesta de etanol (0.2 g/kg) en sujetos, voluntarios –con una ingesta de alcohol moderada o infrecuente– (KUPARI Y OTROS, 1983) y alcohólicos, pretratados con cianamida de calcio (CC) o disulfirán (LINDROS Y OTROS, 1981a) así como en sujetos orientales que experimentan *flushing* (INOUE Y OTROS, 1984) y en japoneses hipersensibles al alcohol (INOUE Y OTROS, 1985).

Por otra parte, la evaluación de la eficacia del 4-MP en el tratamiento de la RED pone de manifiesto que el 4-MP, además de disminuir los niveles de AcH, atenuó algunos de los síntomas típicos de esta reacción, incluyendo el enrojecimiento facial y la taquicardia. Todo esto indica su utilidad en el tratamiento agudo de las RED severas (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985; GESSNER, 1993).

También han sido investigados los efectos de la utilización del 4-MP en el tratamiento de las reacciones al alcohol tras el pretratamiento con cianamida, que genera la llamada Reacción Etanol-Carbimida (REC) (LINDROS Y OTROS, 1981a; KUPARI Y OTROS, 1983), o con nitrefazol, que produce la denominada Reacción Etanol-Nitrefazol (REN) (SUOKAS Y OTROS, 1985).

El 4-MP también se ha utilizado en la investigación sobre los mecanismos patogénicos básicos del daño alcohólico hepático. Respecto a esta línea de investigación los resultados obtenidos son contradictorios ya que, por una parte, se indica que el desarrollo del daño hepático está relacionado con el metabolismo ininterrumpido del etanol más que con la cantidad total de etanol oxidado, la concentración hepática de AcH o el grado de cambio inducido por etanol en el estado redox del sistema NAD/NADH del hígado, estos resultados se han obtenido en estudios en los que se trataban ratas de forma crónica con etanol, indicando que el desarrollo del daño hepático se obtenía solo si los animales recibían también dosis bajas de 4-MP (LINDROS Y OTROS, 1979). Esto sugiere que la consistencia de la influencia de etanol y su metabolismo contribuye a la patogénesis del daño hepático alcohólico, más que el nivel de AcH o el grado de los efectos metabólicos. Sin embargo, por otra parte, investigaciones recientes (ANDERSON Y OTROS, 1997) indican que el AcH es responsable de la inhibición que ejerce el etanol sobre la recuperación de los hepatocitos. En este trabajo se observó que el daño ejercido por el etanol (200 mg/dL) en la recuperación de los hepatocitos era bloqueado por el 4-MP ( $10^{-5}$  mol/L) y potenciado por la pargilina ( $10^{-5}$  mol/L), un inhibidor de la ALDH.

Por otra parte, el estudio de la actuación periférica y central del AcH en la mediación de la ingesta de etanol ha hecho también uso del 4-MP ya que se ha demostrado que el tratamiento combinado de cianamida (25 mg/kg i.p.) y 4-MP (10 mg/kg i.p.) previene la acumulación periférica de AcH generada por la cianamida (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987). Así, los resultados indican que los animales pretratados con 4-MP –animales

del grupo 4-MP-cianamida– consumieron significativamente mayores cantidades de alcohol comparados con los del grupo salina-cianamida (SPIVAK Y AMIT, 1987).

La prevención de la acumulación periférica de AcH tras el tratamiento con un inhibidor de la ALDH como la cianamida ha promovido la utilización del 4-MP también en estudios sobre el efecto del etanol en la actividad locomotora de ratas (SPIVAK Y OTROS, 1987b) y en el CAS inducido por etanol (SPIVAK Y AMIT, 1987) para determinar la mediación del AcH central en las acciones del etanol.

Las determinaciones de etanol en sangre, realizadas en estos estudios, indicaron que el pretratamiento con 4-MP (10 mg/kg) no incrementa los niveles de etanol en sangre (SPIVAK Y OTROS, 1987a). Sin embargo, en un estudio en el que se examinaron las relaciones entre el metabolismo de etanol y el 4-MP en ratas, Rydberg y Neri (1972) demostraron que el 4-MP (10 mg/kg) eleva las concentraciones de etanol a través de su inhibición de la actividad de la ADH. Las discrepancias entre estos estudios podría ser debida a los diferentes tiempos utilizados para el sacrificio de los animales. En el primer caso los animales fueron sacrificados aproximadamente 15 minutos después de la administración de etanol. En el otro estudio los niveles elevados de etanol en los animales tratados con 4-MP, se detectaron solo después de 60 minutos de la administración de etanol.

En función de los datos presentados se podría plantear que la manipulación enzimática del metabolismo del etanol por medio de la alteración de los enzimas implicados, mediante la inhibición de su acción, podría permitir determinar no solo la existencia de un metabolismo central del etanol sino también, y más importante si cabe, comprobar si es el AcH el responsable de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

En este sentido, modificaciones en los enzimas responsables en la formación y degradación del AcH central , quizá mediante la regulación de los niveles de AcH en el cerebro, podrían desempeñar un papel en la mediación de algunas de las acciones farmacológicas del etanol.

Los dos experimentos que se presentan a continuación son el paso previo a la utilización del 4-MP como herramienta farmacológica que permita, mediante la inhibición de



la ADH, una atenuación en el aumento de los niveles periféricos de AcH provocados por la acción inducida por los inhibidores de la ALDH como son la cianamida o el DDTC.

En este sentido, son experimentos que sirven de control, por una parte, para el empleo del 4-MP como pretratamiento en otros experimentos posteriores y, por otra, en la interpretación de los resultados que se obtengan. De este modo, se presentan dos experimentos similares en objetivo pero distintos en estructura. Esta diferencia estructural se debe a las diferencias en los protocolos temporales que se han utilizado para los experimentos realizados con los inhibidores de la ALDH, lo cual impedía la realización de un único experimento que actuara como grupo control para ambos.

El primer experimento (nº 5) sirve como grupo de control para los experimentos realizados en combinación con el DDTC, mientras que el segundo (nº 6) desempeña una función similar en los experimentos en los que se ha utilizado la cianamida.

## **2.2.- Experimentos.**

### **2.2.1.- Experimento nº 5.**

#### **Efecto de la administración aguda de 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol.**

##### *Objetivos.*

Diferentes autores han demostrado que el 4-MP es un inhibidor de la ADH (THEORELL Y OTROS, 1969) generando un bloqueo completo de la acumulación de AcH.

En este sentido y teniendo en cuenta que en esta Tesis Doctoral la mencionada sustancia va a ser utilizada como una herramienta farmacológica para la eliminación de los efectos tóxicos del AcH periférico producidos por el aumento en la concentración de AcH mediante inhibidores de la ALDH, uno de los objetivos de este experimento fue determinar si el 4-MP ejerce, por sí mismo, algún efecto sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones. Al mismo tiempo, se estudió el patrón de interacción entre el 4-MP y el etanol.

##### *Hipótesis.*

1- El 4-MP, por sí mismo, a la dosis empleada y en los intervalos temporales evaluados, no provocará ningún efecto en la actividad locomotora espontánea de los ratones.

2- La interacción farmacológica entre el 4-MP y el etanol será similar a la del grupo control en el que se administrará salina, esto se determinará por la similitud entre las curvas de actividad locomotora inducida por etanol tras la administración de 4-MP o salina.

##### *Procedimiento experimental.*

Para la realización de este experimento se utilizaron 96 ratones macho de las características descritas anteriormente en el apartado de materiales y método.

Tanto el grupo experimental como el control contaban con 48 animales que fueron asignados al azar a los diferentes niveles dentro de cada grupo, de manera que cada uno de los niveles contó finalmente con ocho animales.

Los protocolos experimentales que se siguen en este experimento, en lo referido a la administración de las inyecciones, son reflejo de los protocolos que se mantienen en los experimentos en los que se estudian las propiedades del DDTTC, como inhibidor de la ALDH, en su interacción con el etanol.

Así, en el presente experimento, los animales pertenecientes al grupo experimental fueron pretratados con una inyección i.p. de solución salina, ocho horas después fueron pretratados nuevamente, en este caso con una inyección aguda de una dosis de 10 mg/kg de 4-MP. Cinco minutos después de esta inyección los animales eran tratados con una inyección aguda de etanol a diferentes dosis, las dosis de etanol administradas fueron las siguientes 0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg. Después de cada una de las inyecciones recibidas los animales eran nuevamente situados en sus jaulas.

Media hora después de este último tratamiento –la administración de etanol– los animales eran situados en el aparato de campo abierto para su evaluación.

Por su parte, los animales pertenecientes al grupo control recibieron una inyección de solución salina, ocho horas después fueron pretratados con otra inyección de solución salina y cinco minutos después de esta última inyección recibieron el tratamiento con etanol a diferentes dosis (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Transcurrida media hora de esta inyección, los animales fueron situados en el aparato de campo abierto para la medida de la actividad locomotora.

Los ratones pertenecientes a ambos grupos fueron situados individualmente en el cilindro de campo abierto durante veinte minutos, de los cuales sólo se registraba como

medida de actividad locomotora la que realizaron los animales en los diez últimos minutos del mencionado intervalo temporal.

*Resultados.*

En la figura 5 se representan gráficamente, por una parte, los resultados del efecto de diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg) sobre la actividad locomotora espontánea de los animales y, por otra, el efecto de una inyección aguda de 4-MP (10 mg/kg) en la actividad locomotora inducida por etanol.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA con el GRUPO y las DOSIS como factores entre sujetos. El factor grupo contaba con dos niveles, por una parte, el nivel salina-salina-etanol y por otra, el nivel salina-4-MP-etanol. Mientras que el factor dosis presentaba seis niveles que se correspondían con cada una de las dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Los resultados del ANOVA indicaron un efecto estadísticamente significativo solo para el factor dosis.

Los valores obtenidos de F fueron los siguientes:

Dosis	F (5,84) = 10.840	p < 0.000
Grupo	F (1,84) = 3.207	P < 0.077
Interacción	F (5,84) = 0.357	p < 0.876

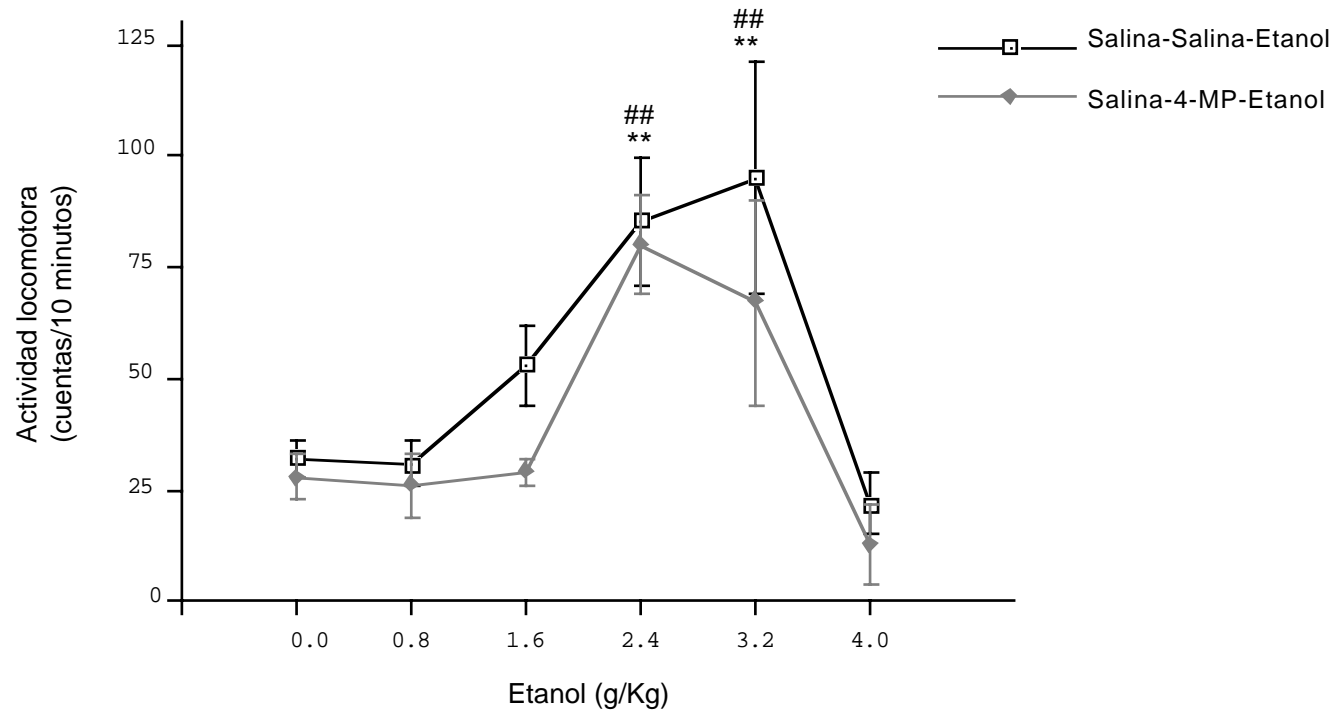
Para determinar las posibles diferencias entre las dosis de etanol, se realizaron las pruebas *a posteriori* de Fisher (LSD) y, como puede observarse en la figura 5, el etanol produjo, tanto en el grupo experimental como en el grupo control, una respuesta bifásica de excitación y depresión de la actividad locomotora.

Tanto para el grupo experimental como para el grupo control, las dosis que presentan diferencias significativas son:

- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0 y 3.2 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 3.2 g/kg de etanol.
- 1.6 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.
- 3.2 y 4 g/kg de etanol.

De forma que se puede afirmar que, en tanto en los animales pretratados con salina como en los pretratados con 4-MP, existe un efecto sobre la actividad locomotora dependiente de la dosis de etanol utilizada, de forma que dosis bajas (0.8, 1.6 g/kg) de etanol no muestran efecto mientras que las dosis moderadas de etanol (2.4 y 3.2 g/kg) inducen un aumento en la actividad locomotora y las altas (4 g/kg) producen un efecto depresivo sobre la misma.

Dado que no se han obtenido diferencias estadísticas ni para el factor grupo ni para la interacción entre los factores dosis y grupo, esto permitiría afirmar que no existen diferencias significativas entre los grupos, es decir que los grupos desde un punto de vista estadístico podrían considerarse similares reciban un pretratamiento con solución salina o con 4-MP.



**Fig. 5:** Efecto del 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con 4-MP (10 mg/kg) cinco minutos antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p < 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol. ##p < 0.01 para las diferencias entre los grupos 4-MP-salina y 4-MP-etanol).

*Discusión.*

A partir de los resultados obtenidos, se podría afirmar, por una parte, que el etanol ejerce un efecto bifásico, de excitación y depresión, sobre la actividad locomotora de los ratones y, por otra, que el 4-MP, por sí mismo, no tiene ningún efecto significativo sobre la acción que el etanol ejerce en la conducta de actividad locomotora.

Otros autores han indicado que el tratamiento con 4-MP en ausencia de etanol produce ataxia motora en ratas medida en el plano inclinado (RYDBERG Y NERI, 1972). Sin embargo, Sinclair y otros (1980) mostraron que el 4-MP no tenía acciones farmacológicas directas sobre la depresión conductual utilizando un test de plano inclinado similar, ya que la presencia del 4-MP, para prevenir la acumulación de AcH, no afectó a la alteración motora inducida por etanol en el plano inclinado.

Por otra parte, los estudios de actividad locomotora en campo abierto que utilizaban 4-MP como bloqueador de los efectos del AcH periférico resultado de la inhibición de la actividad de la ALDH por la cianamida (SPIVAK Y AMIT, 1987) indican también que el 4-MP no tienen ninguna acción directa sobre la actividad locomotora. Este resultado es consistente con lo obtenido por Svensson y Waldeck (1973) utilizando ratones en un paradigma de campo abierto.

Los resultados obtenidos en este experimento van en esta misma línea al demostrar que el el 4-MP por sí mismo no ejerce ningún efecto sobre la actividad locomotora de los ratones. En este sentido, puede observarse que no existen diferencias en la actividad locomotora de los animales en la dosis 0 g/kg de etanol, lo cual permite afirmar que, tanto en los animales pretratados con salina como en los pretratados con 4-MP, la actividad locomotora espontánea no varía y que el 4-MP, a las dosis utilizadas, no ejerce ningún efecto por sí mismo sobre esta actividad.

En cuanto a los efectos del etanol sobre la actividad locomotora, en ambos grupos se obtiene la misma curva bifásica que refleja los efectos de excitación y depresión de esta droga utilizando este paradigma conductual. Los datos indican curvas idénticas desde un punto de vista estadístico ya que no existen diferencias a nivel de interacción entre ninguna de las dosis de etanol utilizadas.

Esta simetría en las curvas obtenidas se plasma también en los resultados que indican que las diferencias intragrupos se dan entre las mismas dosis –por una parte, entre 0; 0.8; 1.6; 4 y 2.4 g/kg y, por otra, entre 0; 0.8; 1.6; 4 y 3.2 g/kg de etanol– tanto en el grupo control como en el experimental.

Estos resultados, tomados en conjunto, ponen de manifiesto la justificación de la utilización, como herramienta farmacológica, del 4-MP en los experimentos realizados para el estudio de las acciones del DDTC, como un inhibidor de la ALDH, en su interacción con el etanol en el paradigma de actividad locomotora.

El experimento que se presenta a continuación tiene como objetivo, al igual que este, posibilitar el empleo del 4-MP en los experimentos en los que se utilizan sustancias que inhiben el enzima ALDH en este caso, la cianamida.

Y, debido a que los protocolos para la cianamida son diferentes de los establecidos para el DDTC, el experimento recoge el mismo objetivo con intervalos temporales diferentes.

### **2.2.2.- Experimento nº 6.**

**El efecto de la administración aguda de 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol.**

#### *Objetivos.*

Como se ha comentado anteriormente este experimento se desarrolló con el objetivo de determinar si el 4-MP tiene por sí mismo algún efecto sobre la actividad locomotora espontánea o en la inducida por etanol en ratones para comprobar su acción con anterioridad a su utilización en los experimentos en los que se administra junto con inhibidores de la ALDH.

Así, al igual que en el experimento relativo al DDTC, el inhibidor de la ALDH presentado en el experimento anterior; en los experimentos realizados para el estudio de la cianamida también se analizó experimentalmente el efecto del 4-MP en dos aspectos.

En este sentido, y teniendo en cuenta que el protocolo experimental en cuanto a la temporalidad entre los tratamientos administrados y la medida de la actividad locomotora



de los ratones es diferente, se evaluó de nuevo el efecto del 4-MP en la actividad locomotora espontánea y en la actividad locomotora inducida por etanol.

De esta forma cada bloque experimental correspondiente a cada uno de los inhibidores analizados posee sus propios grupos control, anulando de este modo el posible efecto que pudiera ejercer el intervalo temporal entre las inyecciones y la evaluación de la conducta.

### *Hipótesis.*

Las hipótesis que se plantearon para este estudio fueron similares a las del experimento anterior ya que el presente experimento se desarrolló con el objetivo de determinar la inocuidad del 4-MP en función de los intervalos temporales que se utilizan en los experimentos en los que se administra cianamida. En este sentido, las hipótesis fueron:

1- El 4-MP, por sí mismo, a la dosis empleada y en los intervalos temporales evaluados, no provocará ningún efecto en la actividad locomotora espontánea de los ratones.

2- La interacción farmacológica entre el 4-MP y el etanol será similar a la del grupo control en el que se administrará salina, esto se determinará por la similitud entre las curvas de actividad locomotora inducida por etanol tras la administración de 4-MP o salina.

### *Procedimiento experimental.*

Para la realización de este estudio se emplearon 96 ratones macho de las características descritas en la sección de materiales y método.

La asignación de los animales a los grupos experimental y control fue aleatoria y cada uno de los grupos estuvo finalmente integrado por 48 ratones, estos fueron a su vez aleatoriamente asignados a los diferentes niveles que componían cada uno de los grupos.

En el presente experimento todos los animales fueron pretratados con una inyección aguda de solución salina, devueltos a sus jaulas y una hora y media después de esta, fueron nuevamente pretratados, con la solución salina los ratones pertenecientes al grupo control y con una inyección de 4-MP, a una dosis de 10 mg/kg, los pertenecientes al

grupo experimental. Tras un intervalo temporal de media hora los animales, pertenecientes a los dos grupos, recibieron el tratamiento intraperitoneal de las diferentes dosis de etanol , estas fueron:

- 0 g/kg.
- 0.8 g/kg.
- 1.6 g/kg.
- 2.4 g/kg.
- 3.2 g/kg.
- 4 g/kg.

Tras este tratamiento los animales eran situados individualmente, durante 20 minutos, en el campo abierto para su evaluación conductual. De los 20 minutos que el ratón estaba en el campo abierto se computaban para la medida de la actividad locomotora los 10 últimos minutos de ese intervalo temporal.

#### *Resultados.*

En la figura 6 se puede observar tanto el efecto que sobre la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 y 4 g/kg) posee el pretratamiento con una única dosis de 4-MP (10 mg/kg), como el efecto de este mismo pretratamiento sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones en un campo abierto.

Para el análisis de los datos resultantes se utilizó una prueba de ANOVA, teniendo como factores entre sujetos las DOSIS y el GRUPO. El factor dosis, contabilizando un nivel por dosis de etanol utilizada (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 y 4 g/kg), presentaba seis niveles.

Por su parte, el factor grupo constaba de dos niveles en función de la presencia o no del pretratamiento con 4-MP.

El análisis mencionado presentó un efecto estadísticamente significativo para el factor DOSIS.

Los valores obtenidos para F son presentados a continuación:

Dosis	F (1,84)= 12.535	p < 0.000
Grupo	F (5,84)= 2.445	p < 0.122
Interacción	F (5,84)= 1.449	p < 0.215

Para determinar entre qué dosis de etanol administradas existían diferencias se llevaron a cabo las pruebas *a posteriori* de Fisher (LSD), obteniendo para los dos grupos evaluados, el experimental y el control, que el etanol ejerce una respuesta bifásica de excitación y depresión de la actividad locomotora de ratones en un campo abierto.

Las dosis para las que se obtuvieron diferencias significativas en el grupo control fueron las siguientes:

- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

Para el grupo experimental las dosis para las que se obtuvieron diferencias significativas fueron las siguientes:

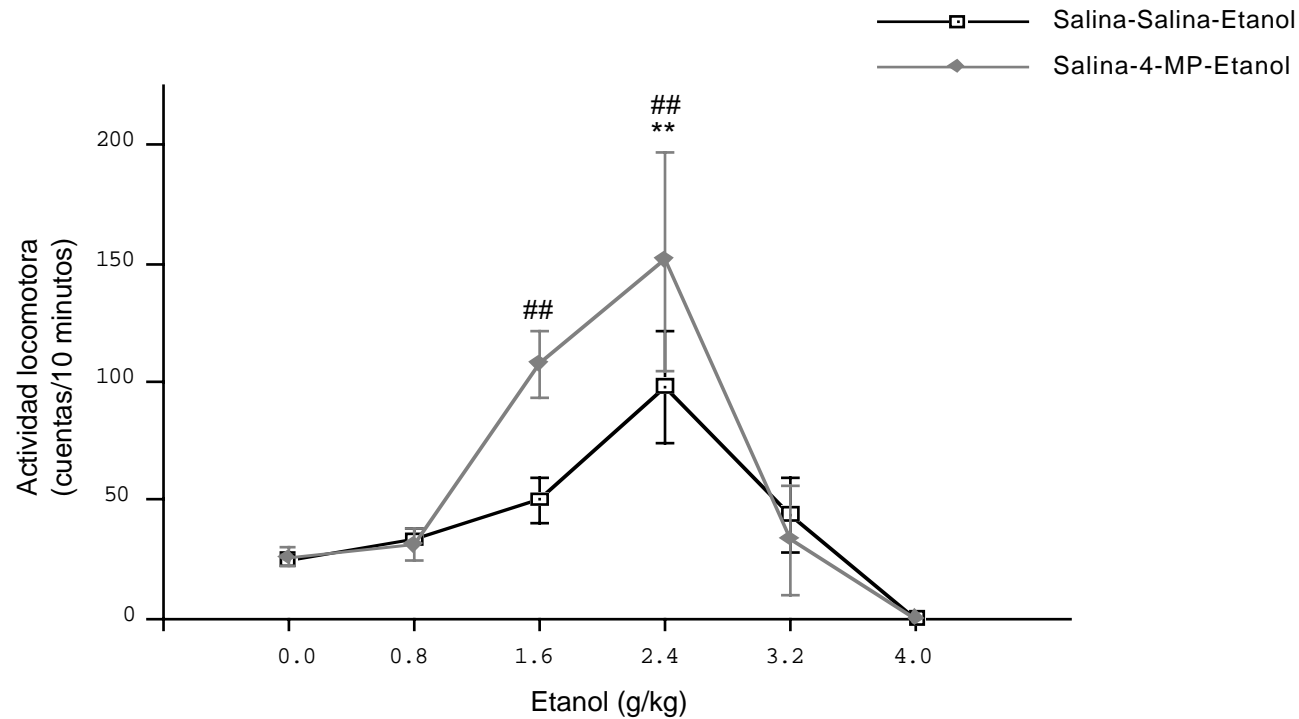
- 0 y 1.6 g/kg de etanol.
- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 1.6 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 3.2 g/kg de etanol.
- 1.6 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

Los datos obtenidos permiten afirmar que tanto en el grupo control, pretratado con solución salina, como en el grupo experimental, pretratado con 4-MP, el etanol ejerce un efecto dependiente de la dosis sobre la actividad locomotora. Sin embargo, se observan diferencias entre ambos en cuanto a las dosis de etanol que producen esta curva bifásica de excitación-depresión.

En este sentido, para el grupo control las dosis bajas de etanol (0.8 y 1.6 g/kg) no generan cambios significativos en la actividad locomotora, la dosis de 2.4 g/kg genera un aumento en la actividad, y las dosis más elevadas (3.2 y 4 g/kg) producen el efecto depresor.

Por otra parte, en el grupo experimental las dosis menores de etanol (0.8 g/kg) no provocan efecto en la actividad locomotora, dándose el efecto activador de la actividad para las dosis intermedias (1.6 y 2.4 g/kg) mientras que en las dosis siguientes (3.2 y 4 g/kg) se obtiene un efecto depresor de la locomoción.

Dado que no se obtuvo un valor significativo para la F del factor grupo ni para la F de la interacción entre los grupos, se podría afirmar que ambos grupos son similares desde un punto de vista estadístico en cuanto a la acción que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora de ambos.



**Fig. 6:** Efecto del 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con 4-MP (10 mg/kg) media hora antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\* $p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol. ## $p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos 4-MP-salina y 4-MP-etanol).

*Discusión.*

Al igual que se obtuvo en el experimento n° 5, el etanol ejerce un efecto bifásico sobre la actividad locomotora de los ratones en un campo abierto. En este sentido, dosis bajas y moderadas (1.6 y 2.4 g/kg) de etanol provocan una inducción de esta actividad mientras que dosis elevadas (3.2 y 4 g/kg) de la droga generan una depresión de la misma.

Por otra parte, también se obtuvo que el tratamiento de los animales con 4-MP no provoca cambios en la actividad locomotora espontánea de los ratones.

En cuanto a la interacción entre los grupos control y experimental, y al igual que se obtuvo en el experimento n° 5, no se observaron diferencias entre los grupos. En este sentido, se podría afirmar nuevamente que la administración del 4-MP, aunque se haya producido una variación del protocolo temporal en la administración de las sustancias, no genera, en su interacción con el etanol, ningún efecto significativo sobre la acción que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora.

Además, como ya se comentó en el experimento anterior, el 4-MP no ejerce por sí mismo ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones. Estos datos son similares a los obtenidos por otros autores en ratones (SVENSSON Y WALDECK, 1973) y en ratas (SINCLAIR Y OTROS, 1980; SPIVAK Y AMIT, 1987). Así, la administración de una dosis de 4-MP (10 mg/kg) como pretratamiento a ratas antes de su evaluación en un campo abierto no provocó cambios en la actividad locomotora de los roedores cuando se compararon los datos de este grupo con la media de actividad de su grupo control (SPIVAK Y AMIT, 1987).

Los resultados que se han obtenido en el presente experimento, tanto para el grupo experimental como para el control, en la dosis de etanol utilizadas, son congruentes con los obtenidos anteriormente por otros autores (SVENSSON Y WALDECK, 1973; SPIVAK Y AMIT, 1987), indicando nuevamente que el 4-MP no ejerce por sí mismo ningún efecto sobre la actividad locomotora.

Por otra parte, también se han observado los efectos bifásicos del etanol sobre la actividad locomotora en los dos grupos evaluados. Sin embargo, las dosis que reflejan el efecto bifásico del etanol son diferentes para los dos grupos, observándose en el grupo experimental una potenciación del efecto del etanol tanto en dosis bajas (1.6 g/kg) como

en las moderadas (3.2 g/kg). Así, respecto al experimento n° 5, para 1.6 g/kg se obtiene un aumento de la actividad locomotora mientras que para la dosis de 3.2 g/kg se da un aumento del efecto depresor. Estos efectos de potenciación en algunas dosis han sido obtenidos anteriormente por Spivak y Amit (1987) de forma que estos autores informaron de incrementos en la actividad locomotora en el grupo pretratado con 4-MP respecto a su correspondiente grupo de salina.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto que el 4-MP puede ser utilizado como una herramienta farmacológica de utilidad ya que se ha comprobado que su administración, siguiendo el protocolo experimental establecido en este experimento en cuanto a la vía de administración, la dosis y el intervalo temporal que guía su administración, no provoca ningún efecto adicional sobre la actividad locomotora espontánea ni en la inducida por la administración de etanol.

En el siguiente punto se exponen las conclusiones que podrían extraerse de los experimentos anteriores.

### 2.3.- Conclusiones.

1- La administración del 4-MP no provoca ninguna alteración de la actividad locomotora espontánea ni de la inducida por etanol, es decir, la actividad locomotora es similar a la que se observa cuando se administra solo salina o, en el segundo caso, la combinación de salina y etanol.

2- En función de los resultados obtenidos, el 4-MP puede ser utilizado, a la dosis utilizada y en los intervalos temporales evaluados, como herramienta farmacológica en los experimentos en los que se evalúa la acción de los inhibidores de la ALDH como DDTC y cianamida.

A continuación se presentan los experimentos realizados con el DDTC. Previamente a esta exposición habría que comentar que aunque la sustancia utilizada como inhibidor del isozima ALDH<sub>2</sub> en los experimentos de esta primera parte es el ácido dietildithiocarbamato (DDTC) su presentación se abordará a partir de la introducción de la droga origen de esta, el disulfirán. Ya que, por una parte, los datos indican que el disulfirán es rápidamente oxidado o reducido dando lugar a su metabolito, el DDTC (FAIMAN, 1979; JOHANSSON, 1986) lo cual permite de forma indirecta hablar del DDTC. Además, también se ha obtenido que tanto el disulfirán, como el DDTC (DEITRICH Y ERWIN, 1971), o el éster metilo de dietildithiocarbamato (DDTC-Me), otro de sus metabolitos, presentan perfiles similares en la inhibición de la ALDH mitocondrial de baja Km de hígado de rata al mismo tiempo que producen también la llamada Respuesta Etanol-Disulfirán (RED) después del tratamiento con etanol (YOURICK Y FAIMAN, 1989). Todo esto permite un acercamiento teórico al DDTC mediante la droga que le da origen, el disulfirán, o desde cualquiera de los metabolitos que esta sustancia origina.

Por otra parte, cabría señalar que uno de los problemas presentados en la redacción de este apartado ha sido la heterogeneidad en cuanto a la denominación de los metabolitos del disulfirán, ya que aunque existen acuerdos en la nomenclatura de los compuestos dentro de cada uno de los grupos de investigación, esta correspondencia no se mantiene entre grupos, mostrando en ocasiones inconsistencias incluso de un artículo a otro.



### **3.- Fase III: Efecto de la administración de DDTC y de la interacción de DDTC y 4-MP.**

#### **3.1.- Introducción teórica.**

##### **3.1.1.- Aspectos generales. El ácido dietildithiocarbamato.**

La sustancia originaria de la cadena metabólica a la que pertenece el DDTC es el disulfirán. Este último compuesto es llamado también tetraetiltiurán y los nombres comerciales por los que se le conoce son Antabuse<sup>®</sup>, Abstinil<sup>®</sup> y Esperal<sup>®</sup>, entre otros.

Con anterioridad a los años cuarenta ya se conocía que la exposición a determinados compuestos orgánicos sulfurados producía reacciones desagradables si estos se daban en combinación con la ingesta de etanol (HALD Y OTROS, 1948; JACOBSEN Y LARSEN, 1949). Más concretamente, los datos informan que Hald y Jacobsen (1948) tomaron alcohol etílico después de haber ingerido disulfirán y sintieron rápidamente una reacción peculiar y altamente desagradable. En función de esos síntomas, que se han dado en llamar Respuesta Etanol-Disulfirán (RED), se propuso al disulfirán para la profilaxis del alcoholismo crónico como un desalentador del consumo de alcohol ya que se pensó que los pacientes que tomaran crónicamente el disulfirán no consumirían al mismo tiempo alcohol por miedo a los efectos desagradables que se derivarían de la reacción producida por la interacción de esas dos sustancias.

Sin embargo, los resultados no han sido todo lo satisfactorios que cabría esperar de forma que para algunos autores el tratamiento con disulfirán ha representado un ejemplo clásico de terapéutica farmacológica excesiva en el tratamiento del alcoholismo (MOTTIN, 1973). Por otra parte, los datos acerca de la efectividad del disulfirán para frenar el alcoholismo son contradictorios ya que aunque algunos autores plantean que es un fármaco efectivo en el tratamiento del alcoholismo en el ser humano (JOHANSSON, 1986; LARSON Y OTROS, 1992; BREWER, 1993; KRISTENSON, 1995) y que tomado diariamente tiene como resultado la abstinencia total en la gran mayoría de los pacientes, pero cuando es el propio sujeto el que debe encargarse de la medicación el cumplimiento del tratamiento por parte de este es muy bajo (GESSNER, 1993). De hecho, algunos resultados indican que la efectividad del disulfirán se debe no tanto a sus efectos farmacológicos como a la motivación por la abstinencia que presente el paciente (CHEVENS, 1953; FULLER Y ROTH, 1979). Además, aunque el uso del disulfirán continúa, la literatura no proporciona una evidencia clínica clara de la contribución farmacológica por parte de esta sustancia al

tratamiento del alcoholismo debido, entre otros aspectos, a los efectos secundarios derivados de su administración (WILSON Y OTROS, 1978; KWENTUS Y MAJOR, 1979; TENNANT, 1986; PEACHEY Y OTROS, 1981c; LITTEN Y ALLEN, 1991; JAFFE Y OTROS, 1992).

### **3.1.2.- Farmacocinética. Administración, absorción, distribución y metabolismo.**

#### **3.1.2.1.- Administración, absorción y distribución.**

Tanto el disulfirán como su mayor metabolito, el DDTC, son ambos estables en medio básico (pH 7.0 - 9.0) pero inestables en medio ácido, por debajo de un pH de 7.0.

Después de su ingestión, el disulfirán es convertido, probablemente en el estómago, en el complejo de cobre denominado dietildithiocarbamato. De esta forma, en estos dos mecanismos como son la absorción y distribución, vía la mucosa gastrointestinal, en la sangre podrían estar implicados tanto la droga principal como el complejo de cobre. En la sangre, estas dos sustancias son rápidamente degradadas a la forma DDTC (JOHANSSON, 1986; 1992).

Por otra parte, los estudios de determinación de posibles diferencias en la absorción de la sustancia en función de la vía de administración, ponen de manifiesto que esta no es un factor determinante. Así, la administración a ratas de una dosis de disulfirán (7 mg/kg) por vía i.p. o por vía oral (p.o.) pone de manifiesto que la captación o absorción en diferentes tejidos como el riñón, el páncreas, el hígado y el cerebro, entre otros, fue similar para las dos rutas de administración (FAIMAN Y OTROS, 1980).

En cuanto a la distribución del disulfirán y sus metabolitos en el organismo, estos se han encontrado en el tiroides, las glándulas adrenales, el páncreas, el estómago, el intestino grueso y el delgado, el hígado, los testículos, el riñón, los pulmones, el bazo y el corazón (STROMME, 1966; FAIMAN Y OTROS, 1978). Estos datos se basan en estudios sobre el metabolismo de estas sustancias utilizando disulfirán radioactivo. Así, tras la administración por vía intraperitoneal del ácido <sup>35</sup>S-dietildithiocarbámico, se obtuvo que la mayor concentración del tiol se detectó en plasma, hígado y riñón, siendo el cerebro la estructura donde la concentración del ácido <sup>35</sup>S-dietildithiocarbámico fue menor.

### 3.1.2.2.- Metabolismo.

Químicamente el disulfirán es el disulfuro de dithiocarbamato. En la curva metabólica del metabolismo del disulfirán se da primero, por un proceso de reducción de la unión del disulfido con su correspondiente tiol, el metabolito DDTC (ver cuadro 3, pág. 152).

En estudios *in vitro*, Cobby y otros (1977a) encontraron que en el total de la sangre el disulfirán es reducido rápidamente al tiol en 4 minutos. Es decir, que el disulfirán necesita cuatro minutos tras su administración para reducirse a DDTC. Esta reducción ha sido observada también *in vivo* (GESSNER, 1993; JIN Y OTROS, 1994). De hecho, el DDTC es el producto de la primera degradación del disulfirán en humanos (MASSO Y KRAMER, 1981), siendo esta degradación producida por la glutathiona reductasa del plasma (COBBY Y OTROS, 1977a) y la albúmina (AGARWAL Y OTROS, 1983). Este DDTC producido es, posteriormente, metabolizado por medio de cuatro vías diferentes. Estas vías son la glucoronidación, una degradación no enzimática, la metilación y la oxidación (ENEANYA Y OTROS, 1981).

En la glucoronidación, se produce la conjugación del DDTC con el ácido glucorónico, formando el DDTC-glucoronide que es excretado por el riñón. Siendo este el mayor mecanismo de desintoxicación del disulfirán que presenta el organismo en humanos y animales (KASALDER, 1963).

En la degradación no enzimática, el dithiocarbamato a su vez es hidrolizado a dietilamina, la cual es excretada en la orina, y a disulfuro de carbono ( $CS_2$ ), que es excretado con la respiración (ASPILA Y OTROS, 1969; GESSNER, 1993). En esta vía el rango de descomposición del DDTC es dependiente del pH, de forma que la rápida descomposición de este metabolito en dietilamina y disulfuro de carbono solo se produce en medio ácido (STROMME, 1966).

Además, se ha observado que en algunos pacientes, los enzimas hepáticos convierten rápidamente el DDTC en  $CS_2$ ; sin embargo, en otros pacientes con menos actividad enzimática aparece más cantidad de DDTC en la orina (IBER Y OTROS, 1977). En este sentido, se ha demostrado que hay dos variantes genéticas implicadas en la conversión de disulfirán a  $CS_2$  y de ahí a óxido sulfúrico ( $SO_4$ ), una que lo convierte rápidamente y otra que, por el contrario, realiza una conversión lenta (DJURIC Y OTROS, 1973).

1978), y en humanos (FAIMAN Y OTROS, 1984; COBBY Y OTROS, 1977b) con la s-adenosil metionina transmetilasa catalizando la reacción (FAIMAN, 1979; ENEANYA Y OTROS, 1981). El dietildithiometilcarbamato mediante una biotransformación oxidativa es transformado a dietilthiometilcarbamato, que es posteriormente oxidado a sus correspondientes metabolitos sulfoxide (DDTC-Me sulfoxide), sulfone (DDTC-Me sulfone) (JOHANSSON, 1992) y sulfine (DDTC-Me sulfine) (MADAN Y FAIMAN, 1995).

Durante el proceso de oxidación, Strömme (1965) ha demostrado la reoxidación del DDTC a disulfirán. Sin embargo, esta reoxidación implicaba solo al 4% del DDTC formado. Por otra parte, se sabe que, en general, en presencia de oxígeno atmosférico el DDTC puede ser reoxidado a disulfirán y que esta reoxidación puede ser efectuada por las oxidasas del organismo. De hecho, existe un mecanismo potencial como la catalasa, la metemoglobina, el citocromo c y la xantina oxidasa que se ha utilizado para apoyar la hipótesis de que el DDTC es reoxidado a disulfirán *in vivo* y que sería este último el responsable de la inhibición de la ALDH (KITSON, 1975).

Por otra parte, los estudios *in vitro* realizados por Masuda (1988) han sugerido que el DDTC es reoxidado a disulfirán por un mecanismo dependiente del citocromo P-450 y, aunque no se ha demostrado que esto ocurra *in vivo*, esto podría proporcionar una explicación de por qué el disulfirán es inefectivo cuando se da a ratas después de la administración de un inhibidor de este citocromo (YOURICK Y FAIMAN, 1991; HART Y FAIMAN, 1992; MADAN Y OTROS, 1993; FAIMAN Y MADAN, 1993; MADAN Y FAIMAN, 1995).

### **3.1.3.- Detección en tejidos.**

El disulfirán y algunos de sus metabolitos han sido detectados en organismos humanos (MASSO Y KRAMER, 1981; JOHANSSON, 1986) y animales (FAIMAN Y OTROS, 1977).

En este sentido, se realizó una determinación simultánea de DDTC y DDTC-Me, en plasma humano, a partir del disulfirán mediante la técnica de cromatografía líquida. Este método es lo suficientemente sensible como para permitir determinaciones de DDTC en pacientes que reciben dosis terapéuticas (250 o 500 mg) de disulfirán mediante una única dosis oral (MASSO Y KRAMER, 1981). La confirmación de que el disulfirán es inestable en sangre y plasma humanos ha sido obtenida también mediante *high performance liquid chromatography* (HPLC) (JOHANSSON, 1986).

También se ha detectado disulfirán, DDTC y DDTC-Me en plasma y orina de perro, tras una administración i.v., y en cerebro de ratón, después de una administración i.p., mediante un método analítico que determina disulfirán, DDTC y DDTC-Me radioactivos por medio de la extracción o precipitación de los compuestos individuales (FAIMAN Y OTROS, 1977).

### 3.1.4.- Bioactivación.

Respecto a si el disulfirán necesita o no ser bioactivado para ejercer su acción inhibitoria sobre la ALDH, existen datos contradictorios. De forma que el debate, sobre si es el disulfirán o algunos de sus múltiples metabolitos la sustancia activa que media la acción, sigue abierto. En este sentido, algunos autores plantean que el disulfirán inhibe *in vitro* (KITSON, 1975), otros plantean que esta sustancia no ejerce por sí misma la inhibición de la ALDH con baja Km *in vitro* sino que debe actuar a través de un metabolito (GESSNER, 1993). Otros autores (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991; GESSNER Y GESSNER, 1992a, b; HART Y FAIMAN, 1993) han planteado que solo inhibe *in vivo* después de su bioactivación. Esto ocurre porque el disulfirán en sí mismo es virtualmente indetectable *in vivo*, siendo rápidamente reducido al ion DDTC y posteriormente metabolizado (COBBY Y OTROS, 1977a).

Otros trabajos indican que el DDTC es el compuesto inhibidor activo *in vivo* (LI Y VALLEE, 1969). Por su parte, Johansson (1989) plantea que el éster metilo S-metilo-N,N-dietilthiolcarbamato (DETC-Me) es el metabolito activo del disulfirán. De forma que el DETC-Me interactuaría con la ALDH por un mecanismo similar al de los inhibidores suicidas. Mientras que otros autores han encontrado datos que indican que todos inhiben la ALDH de baja Km *in vivo*, pero no con la misma potencia de inhibición. En este sentido, algunos autores plantean que sería el S-metil N,N-dietilthiolcarbamato sulfoxide (DECT-MeSO), el último de los metabolitos detectados del disulfirán, el que presentaría la mayor potencia (HART Y FAIMAN, 1992; 1994). De forma que respecto a la potencia de inhibición, se seguiría el siguiente orden: DECT-MeSO > DECT-Me > DDTC-Me sulfine > DDTC-Me > DDTC > disulfirán (HART Y FAIMAN, 1993).

Sustancia	<i>In vivo</i> ID <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μmol/kg)	
Disulfirán	(297) <sup>b</sup>	190
DDTC	(171)	104
DDTC-Me	(163)	95
DDTC-Me sulfine	(179)	57
DETC-Me	(147)	44
DETC-Me sulfoxide	(163)	22
DDTC-Me sulfoxide	(179)	170

<sup>a</sup>De YOURICK Y FAIMAN, 1989; HART Y OTROS, 1990; HART Y FAIMAN, 1992; MADAN Y FAIMAN, 1994b.

<sup>b</sup>Los números entre paréntesis indican los pesos moleculares de las drogas.

En relación con la necesidad de una bioactivación, se han realizado diferentes estudios con el objetivo de determinar el posible papel de esta bioactivación del disulfirán. Y, en general, los datos parecen apoyar que la bioactivación del disulfirán es un requerimiento para la inhibición de la ALDH<sub>2</sub> por parte del disulfirán (YOURICK Y FAIMAN, 1991; HART Y FAIMAN, 1993).

En este sentido, se analizó el papel de la bioactivación en la acción del disulfirán como un inhibidor de la ALDH mitocondrial de baja Km de hígado de rata por Yourick y Faiman (1991). En esos estudios DDTC, DETC-Me, DDTC-Me y disulfirán fueron analizados para determinar el papel de la bioactivación para que el disulfirán ejerza su acción como inhibidor de la ALDH de baja Km hepática de rata.

Así, los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* de incubaciones de mitocondria de hígado de rata con disulfirán y DDTC (0.01 a 2.0 mM) mostraron la generación de una inhibición de la ALDH dependiente de la dosis. Además, la adición de microsomas a estas incubaciones mitocondriales *in vitro* incrementó notablemente la inhibición producida por el DDTC –aunque esto solo ocurrió en concentraciones menores de 0.05 mM–, DDTC-Me y DETC-Me (2.0 mM para ambos), pero no la inducida por disulfirán (YOURICK Y FAIMAN, 1991).

Por su parte, los resultados de los análisis *in vivo* indican que todas las sustancias produjeron una inhibición, tras una administración i.p., de la ALDH de ratas hembra.

El pretratamiento con un inhibidor del citocromo P-450, el N-octilimidazol (NOI) bloqueó la inhibición de la ALDH ejercida por disulfirán, DDTC, DDTC-Me y DETC-Me *in vivo*, e *in vitro* cuando los microsomas se añadieron al medio de incubación.

Tanto el estudio *in vivo* como el realizado *in vitro* indican que se necesita bioactivación del disulfirán para que se produzca, en primer lugar, la inhibición de la ALDH y, en segundo lugar, la RED.

Por otra parte, los estudios realizados por Hart y Faiman (1993) muestran también la necesidad de una bioactivación del disulfirán.

Así, los estudios *in vitro* indican una inhibición del DETC-Me bloqueada casi completamente por la administración previa de 1-benzilimidazol (NBI) (20 mg/kg; 3 mL/kg, ip), esta sustancia es un inhibidor competitivo, reversible y no específico del citocromo P-450 (WILKINSON Y OTROS, 1974) y se utilizó como herramienta farmacológica para estudiar el metabolismo del DECT-Me y del DECT-MeSO.

En los estudios *in vivo* los datos indicaron que el DETC-Me produjo una inhibición de la actividad de la ALDH mitocondrial hepática de baja Km del 75% mientras que si el NBI estaba presente solo se producía una inhibición del 15%. El rango de metabolismo del DETC-Me fue similar al rango de formación del DETC-MeSO de forma que la acción del NBI se acompañó de un aumento en plasma de DECT-Me y una disminución de DECT-MeSO. A partir de estos datos se podría afirmar que el citocromo mediante su mecanismo oxidativo tiene un importante papel en la formación de DETC-MeSO y en su acción como inhibidor de la ALDH.

Respecto al DECT-MeSO, el pretratamiento a ratas con NBI previo a la administración de esta sustancia no bloqueó la inhibición que este metabolito ejerce sobre la ALDH.

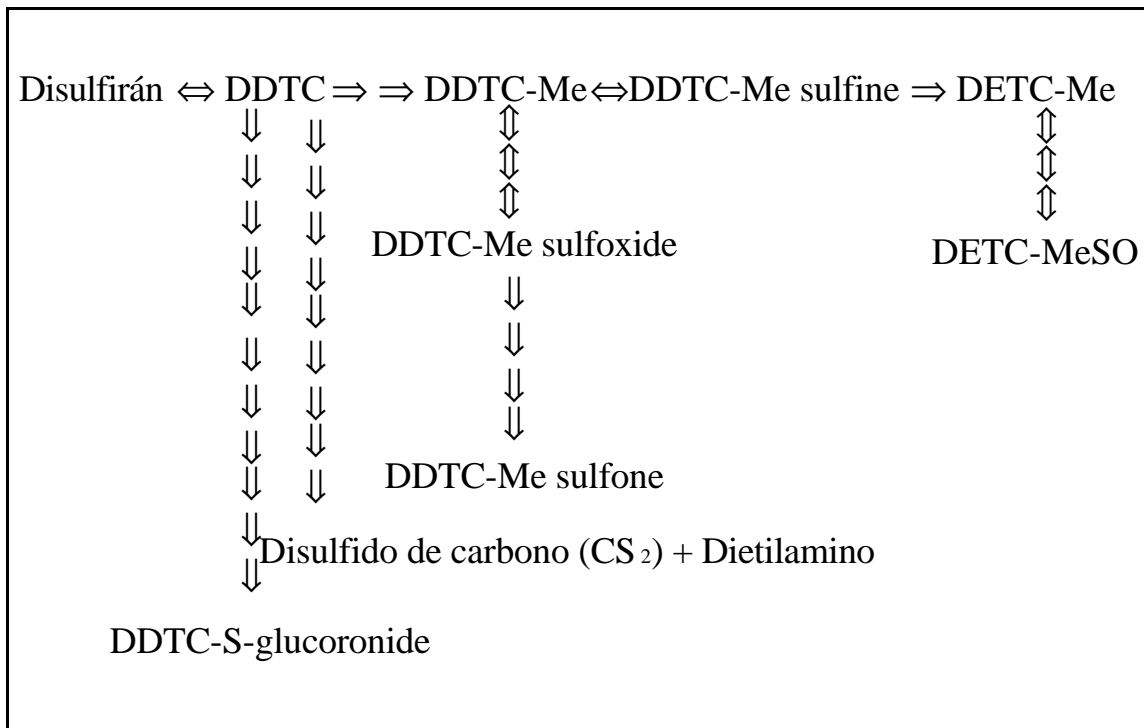
Los datos indican que el paso de DECT-Me a DECT-MeSO está mediado por el P-450 y que la inhibición del citocromo por inhibidores como el NBI bloquea la inhibición de la ALDH de baja Km por el DECT-Me.

Todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la bioactivación del disulfirán para ejercer su acción *in vivo* sobre la ALDH.

A modo de resumen, cabría señalar que los intermediarios formados en el proceso de bioactivación del disulfirán incluyen al DDTC (COBBY Y OTROS, 1977a), al DDTC-Me (GESSNER Y JAKUBOWSKI, 1972), dos metabolitos de este como son el metilo de dietildithiocarbamato sulfine (DDTC-Me sulfine) y el metilo de dietildithiocarbamato sulfoxide (DDTC-Me sulfoxide) (MADAN Y FAIMAN, 1994a), además, a partir de este último se metaboliza el metilo de dietildithiocarbamato sulfone (DDTC-Me sulfone) (JOHANSSON, 1992). La cadena seguiría a partir del DDTC-Me sulfine con el DETC-Me (HART Y OTROS, 1988; 1990; JOHANSSON Y OTROS, 1989) y, ya por último, a partir de este se obtiene el DETC-MeSO (HART Y FAIMAN, 1994).

Así, en el siguiente cuadro se recoge gráficamente el mencionado metabolismo.

Cuadro 3. Metabolismo del disulfirán





### 3.1.5.- Inhibición de la ALDH mitocondrial.

El disulfirán ha venido siendo utilizado como un inhibidor del enzima ALDH hepático hecho que ha posibilitado y promocionado su utilización como fármaco de gran valor en el tratamiento del alcoholismo (MOTTIN, 1973; KWENTUS Y MAJOR, 1979) ya que la inhibición que produce en la ALDH genera en el organismo una serie de cambios que se plasman en lo que en conjunto, como anteriormente se ha visto, se ha dado en denominar RED.

Así, el disulfirán y el DDTC inhiben la ALDH de forma similar (DEITRICH Y ERWIN, 1971). Estas dos sustancias son potentes queladores del cobre así como de otros metales. La quelación de la porción de un metal de un enzima por disulfirán o DDTC podría conducir a la inactivación de ese enzima. Los enzimas que contienen metales que pueden ser inhibidos por disulfirán o DDTC incluyen a los enzimas que contienen zinc, como la ALDH (STOPPANI Y OTROS, 1966) y a los enzimas que son dependientes del cobre, como la aldehído oxidasa y la DBH (KAUFMANN Y FRIEDMAN, 1965). Por lo que se ha planteado que el mecanismo de inhibición de la ALDH por el disulfirán y su metabolito, el DDTC, es debido a la quelación de los metales esenciales para la actividad enzimática o la inhibición competitiva entre el grupo C=O del AcH y el grupo C=S del disulfirán (DE SAINT-BLANQUAT Y DERACHE, 1976).

De esta forma, el disulfirán y el DDTC generan una inhibición pronunciada e irreversible del enzima tanto *in vivo* (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983; YOURICK Y FAIMAN, 1989; PETERSEN, 1992; JIN Y OTROS, 1994) como *in vitro* probablemente mediados por un metabolito (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983; JIN Y OTROS, 1994) aunque el DDTC es menos potente que el disulfirán en la inhibición *in vitro* (KITSON, 1975) e *in vivo* (YOURICK Y FAIMAN, 1989). Este hecho ha generado que algunos autores planteen que el DDTC es efectivo *in vivo* a causa de su reoxidación a disulfirán (STRÖMME, 1963; STRÖMME Y ELDJARN, 1966; DEITRICH Y ERWIN, 1971).

Un estudio realizado por Yourick y Faiman (1989) para comparar las características del disulfirán y sus dos primeros metabolitos, el DDTC y el DDTC-Me, pone de manifiesto que la máxima inhibición del enzima ocurre cuatro horas después de la administración del disulfirán (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982), ocho horas después para el DDTC y dos horas después para el DDTC-Me, dándose una inhibición del 70, 65 y 75% ocho horas después del tratamiento con disulfirán, DDTC y DDTC-Me respectivamente. El grado de inhibición de la ALDH mitocondrial hepática de baja Km fue igual para las tres sustancias en el intervalo comprendido entre 8 y 172 horas después de la administración de estas sustancias. Con ninguna de estas drogas obtuvo inhibición de la ALDH de alta Km.

Por otra parte, en ratas pretratadas con disulfirán (75 mg/kg), DDTC (114 mg/kg) y DDTC-Me (41.2 mg/kg) y ocho horas después tratadas con etanol (1 g/kg 20% v/v) se obtuvieron perfiles temporales similares para las concentraciones de AcH y etanol en sangre. Además, también se dio una RED, evaluada como hipotensión y taquicardia, similar para las tres drogas; sin embargo, la hipotensión correlacionó con los niveles de AcH en sangre pero no con los de etanol. De hecho, no existen diferencias en el perfil temporal de la concentración de etanol en sangre tras la administración de los inhibidores respecto al grupo control, de forma que se podría afirmar que los inhibidores no producen un aumento en los niveles de etanol en sangre (YOURICK Y FAIMAN, 1989).

En definitiva, los datos indican que las propiedades en cuanto a la relación de sensibilización con el etanol son similares para las tres sustancias, aunque el DDTC-Me sería un metabolito activo más potente que el disulfirán y el DDTC. Por su parte, algunos autores (DEITRICH Y ERWIN, 1971) plantean que una de las razones para el menor rango de inhibición por parte del DDTC se debe probablemente a las propiedades hidrofílicas del compuesto y a su lenta distribución comparado con las características lipofílicas que presenta el disulfirán.

Otros estudios sobre DDTC-Me, el mayor metabolito del disulfirán, formado en tres pasos metabólicos a partir de este (YOURICK Y FAIMAN, 1987), indican que esta sustancia inhibe irreversiblemente a la ALDH, ya que tras la administración de una única dosis (41.2 mg/kg i.p.) de este metabolito la inhibición del isozima se prolongó durante 168 horas (YOURICK Y FAIMAN, 1987; HELANDER Y JOHANSSON, 1989). En ratas este metabolito puede actuar como un inhibidor suicida con preferencia por el isozima ALDH de baja  $K_m$  (ALDH<sub>2</sub>), pero sin afectar a la ALDH de alta  $K_m$  (YOURICK Y FAIMAN, 1987) mientras que sus dos metabolitos oxidados, el sulfoxide y el sulfone, especialmente este último, son potentes inhibidores no solo de la ALDH<sub>2</sub> sino también de la ALDH citosólica de alta  $K_m$  (ALDH<sub>1</sub>). La reacción inhibitoria entre el enzima y cada uno de los metabolitos es caracterizada por la formación de un aducto covalente, probablemente con la cisteína residual como lugar activo de los enzimas (JOHANSSON, 1992).

La inhibición de la ALDH por el DDTC-Me *in vivo* es dosis dependiente, 11 % y 90% para un rango de dosis que comprende desde 1.8 hasta 158 mg/kg (YOURICK Y FAIMAN, 1987). Sin embargo, los datos indican su inactividad *in vitro* (KITSON, 1976; HART Y OTROS, 1990).

La dosis letal para el 50% de la muestra ( $LD_{50}$ ) para el DDTC-Me administrado i.p. a ratas y a ratones fue de 167 y 263 mg/kg respectivamente. Los síntomas de toxicidad que precedían la muerte de los animales eran similares a los síntomas observados por la toxicidad del disulfirán (FAIMAN Y OTROS, 1983).

Por otra parte, en sujetos humanos tratados con disulfirán las concentraciones en plasma de DDTC-Me son proporcionales a las dosis de disulfirán preadministradas. Obteniendo también una relación significativa entre la formación oxidativa de DDTC-Me, la formación de AcH y una serie de aspectos que eran válidos para conformar una RED (JOHANSSON, 1992).

Además, algunos autores han planteado que la presencia de este metabolito en sangre puede servir como marcador de la función metabólica oxidativa del hígado y de la efectividad terapéutica del tratamiento en cuanto a la concentración apropiada en la dosis de disulfirán (JOHANSSON, 1992; PETERSEN, 1992).

En relación con esto, también los metabolitos del DDTC-Me han sido estudiados para determinar sus características activas, *in vivo* e *in vitro* en relación con el disulfirán y los demás compuestos procedentes de este. Estos metabolitos son el DDTC-Me sulfoxide (MADAN Y FAIMAN, 1994a, b), el DDTC-Me sulfine (MADAN Y FAIMAN, 1994a; 1995) y el DETC-Me (HART Y OTROS, 1988; 1990; JOHANSSON Y OTROS, 1989). Este último para algunos autores (HART Y OTROS, 1988; 1990; JOHANSSON Y OTROS, 1989) se clasificaría como un metabolito del DDTC-Me sulfine y no del DDTC-Me.

Respecto al DDTC-Me sulfoxide se sabe que es el producto de una bioactivación del DDTC-Me mediante el sistema microsomal de monooxigenasas (MADAN Y FAIMAN, 1994a). Los estudios *in vivo* (HART Y OTROS, 1990; HART Y FAIMAN, 1992; MADAN Y FAIMAN, 1994b) del curso temporal de la inhibición de la ALDH tras la administración de esta sustancia, ponen de manifiesto que la máxima inhibición del isozima se produce ocho horas después de su administración (45.2 mg/kg), recuperándose la actividad de la ALDH 48 horas después de esta administración.

El estudio de las dosis que inhiben *in vivo* a la ALDH mediante este metabolito, indica que la mayor inhibición (65%) se consiguió con la dosis de 90.4 mg/kg. Y dado que esta sustancia produce irritación de la cavidad intraperitoneal, que es mayor a mayor dosis del metabolito, no se administraron dosis mayores de la sustancia y no se obtuvo una inhibición mayor del 65%.

Los datos que lo comparan con otros metabolitos indican que aunque el DDTC-Me sulfoxide inhibió la ALDH *in vivo*, no fue detectado en plasma 0.5 y 2 horas después de la administración de disulfirán (75 mg/kg), DDTC-Me (122.25 mg/kg), DDTC-Me sulfoxide (45.2 mg/kg). Sin embargo, a partir de la administración de DDTC-Me sulfoxide sí se detectaron en sangre el DDTC-Me y el DETC-Me (MADAN Y FAIMAN, 1994b).

*In vivo*, el metabolito tampoco fue tan potente como el DETC-MeSO, siendo la dosis que genera el 50% de inhibición ( $ID_{50}$ ) de 170  $\mu\text{mol/kg}$  (31 mg/kg) y 22  $\mu\text{mol/kg}$  respectivamente (HART Y FAIMAN, 1992). Además, también fue menos potente que su precursor, el DDTC-Me que presenta una  $ID_{50} = 95 \mu\text{mol/kg}$  (YOURICK Y FAIMAN, 1989), mientras que el DETC-MeSO es más potente que su precursor, el DETC-Me (HART Y OTROS, 1990).

Lo anterior podría deberse o a que el metabolito no presentaba una concentración suficiente para inhibir a la ALDH por su absorción incompleta o por su rápida deactivación; o ser debido a que la bioactivación del DDTC-Me *in vivo* generó la formación de otro inhibidor de la ALDH además del DDTC-Me sulfoxide. Esta segunda posibilidad parece más plausible porque el DDTC-Me es bioactivado a DETC-MeSO (HART Y FAIMAN, 1992), que es más potente que el DDTC-Me sulfoxide.

Así, la inhibición de la  $ALDH_2$  observada después de la administración del DDTC-Me sulfoxide puede estar mediada en parte por el DETC-MeSO, y esto podría explicar por qué el DDTC-Me sulfoxide no es solo menos potente, sino también su menor acción sobre la  $ALDH_2$  frente al DETC-MeSO.

En este sentido, DDTC-Me y DETC-Me fueron detectados después de la administración a ratas de DDTC-Me sulfoxide, lo que sugiere que el DETC-MeSO puede también ser un metabolito del DDTC-Me sulfoxide.

Por otra parte, los datos procedentes de los estudios *in vitro* (HART Y OTROS, 1990; MADAN Y FAIMAN, 1994b, 1995) indican que el DDTC-Me sulfoxide ( $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) no fue un inhibidor tan potente como el DETC-MeSO. De hecho, bajo condiciones experimentales idénticas el DDTC-MeSO genera una inhibición mayor con una concentración 13 veces menor que la utilizada por el DDTC-Me sulfoxide. Además,

aunque ambos generan inhibición *in vitro* sus precursores, el DDTC-Me y el DETC-Me no son buenos inhibidores *in vitro* (YOURICK Y FAIMAN, 1991; HART Y FAIMAN, 1992).

A modo de resumen, se podría decir que este metabolito inhibe *in vivo* e *in vitro*, pero es el menos potente de los metabolitos del disulfirán seguramente porque parece que es reducido a DDTC-Me y entonces metabolizado a DDTC-Me sulfine, a DETC-Me y posteriormente a DETC-MeSO (MADAN Y FAIMAN, 1994b).

Este estudio, y otros anteriores (HART Y FAIMAN, 1994), ponen de manifiesto que el DETC-MeSO es el metabolito aparentemente responsable de la inhibición de la ALDH<sub>2</sub> *in vivo*.

El segundo de los metabolitos del DDTC-Me que ha sido estudiado es el DDTC-Me sulfine (MADAN Y FAIMAN, 1995). Los estudios sobre la formación de este metabolito indican que además de la mediación del sistema microsomal de monooxigenasa, las monooxigenasas que contienen flavienzimas (FMO) tienen una contribución parcial en la formación de este ya que en presencia de las FMO se produce una inhibición de su formación de 30-50% (MADAN Y FAIMAN, 1994a).

Los datos indican que este es un inhibidor *in vivo* de la ALDH ( $ID_{50} = 57 \mu\text{mol/kg}$  (10.2 mg/kg), pero *in vitro* no presenta muestras de esta inhibición.

Los resultados de los estudios *in vivo* muestran que la máxima inhibición de la ALDH se dio una hora después de la administración i.p. de esta sustancia (45.2 mg/kg), recuperándose la actividad de la ALDH 168 horas después de la administración del metabolito.

Este metabolito, al igual que el anterior, tampoco se detectó en plasma después de la administración i.p. de disulfirán (75 mg/kg), DDTC-Me (122 mg/kg) o DDTC-Me sulfine (22.6 mg/kg). Sin embargo, el DETC-Me, la forma desulfurada del DDTC-Me, fue detectado como un metabolito del DDTC-Me sulfine en plasma de rata después de la administración del DDTC-Me sulfine.

Si el DDTC-Me sulfine es metabolizado a DETC-Me y posteriormente a DETC-MeSO y estas dos sustancias producen una RED podría esperarse lo mismo para el metabolito DDTC-Me sulfine y esto es lo que se obtiene ocho horas después del pretratamiento a ratas con DDTC-Me sulfine y la posterior exposición al etanol (1 g/kg). De forma que se obtuvieron niveles elevados de AcH en sangre de 0.5 a 2 horas después

de la exposición al etanol, que fueron indetectables cuatro horas después de este tratamiento (MADAN Y FAIMAN, 1995).

Todos estos datos apoyan la idea de que el DDTC-Me sulfine es un intermediario formado después del metabolismo del DDTC-Me y es probablemente un precursor del DETC-Me en la bioactivación global del disulfirán a DETC-MeSO.

El tercero de los metabolitos estudiados ha sido el DETC-Me. Los datos obtenidos indican que este es un inhibidor *in vivo* de la ALDH de baja Km más potente que el disulfirán, el DDTC o el DDTC-Me. El comienzo de la inhibición de la ALDH por el DETC-Me, el precursor inmediato del DETC-MeSO, se da en 30 minutos (HART Y OTROS, 1990), esto es debido probablemente a que presenta un mayor grado lipofílico. Sin embargo, los datos muestran que es inactivo *in vitro* (HART Y OTROS, 1990), aunque a altas concentraciones y tras un largo periodo de incubación sí ha demostrado inhibición de la actividad deshidrogenasa *in vitro* (HELANDER Y JOHANSSON, 1989; JOHANSSON Y OTROS, 1989; KITSON, 1991).

De hecho los datos indican que la ID<sub>50</sub> para estas sustancias ha sido 6.5 mg/kg para DETC-Me; la máxima inhibición obtenida por este *in vivo* se obtuvo 30 minutos después de su administración y mostrando al mismo tiempo su ineffectividad como inhibidor *in vitro*; 15.5 mg/kg para DDTC-Me, 56.2 mg/kg para disulfirán, 15.5 mg/kg para DDTC (HART Y OTROS, 1990) y 3.5 mg/kg para el DETC-MeSO (HART Y FAIMAN, 1992). A partir de este último dato, algunos autores (GESSNER Y JAKUBOWSKI, 1972; FAIMAN Y OTROS, 1978) plantean que podrían esperarse valores similares a los del DETC-MeSO para el DDTC y el DDTC-Me ya que este se obtiene de una rápida metilación del DDTC.

Finalmente, el último de los metabolitos analizados ha sido el DETC-MeSO. Esta sustancia que se obtiene por la oxidación de la sal de sodio del DDTC con peróxido de hidrógeno seguido por una metilación (MADAN Y FAIMAN, 1994a) es un potente inhibidor de la ALDH de rata de baja Km tanto *in vivo* como *in vitro* (HART Y FAIMAN, 1992; 1994; MADAN Y FAIMAN, 1994b).

Como se comentó anteriormente, en la sección referida a la bioactivación del disulfirán, no está claro si es este o alguno de sus metabolitos el responsable de la inhibición del isozima ALDH<sub>2</sub>. Este hecho ha llevado a que prácticamente todos los metabolitos del disulfirán hayan sido propuestos como el metabolito activo o el precursor de las especies químicas responsables de la inhibición de la ALDH de baja Km. Así, el DDTC-Me podría ser el metabolito activo *in vitro* del disulfirán (HELANDER Y JOHANSSON,

1989). También el DETC-Me ha sido propuesto como metabolito activo (HART Y OTROS, 1990). Por su parte, Hart y Faiman (1992) han propuesto que el DETC-MeSO parece ser la especie química en la que el disulfirán debe ser bioactivado para poder ejercer su función inhibitoria siendo de esta forma el metabolito más probable de la inhibición que el disulfirán ejerce sobre la actividad de la ALDH de baja Km de hígado de rata (HART Y FAYMAN, 1992; MADAN Y FAIMAN, 1994b).

Los estudios realizados indican que el proceso de bioactivación por el que esta sustancia se obtiene incluye una reducción, una metilación y dos oxidaciones sucesivas. Se ha intentado determinar la contribución del P-450 y de las FMO, –ya que los grupos funcionales que contienen sulfuro son sustratos para estos compuestos–, en la formación del DETC-MeSO a partir de su más inmediato precursor, el DETC-Me. Los resultados indican que el citocromo ejerce un importante papel en la catalización de la sulfoxidación del DETC-Me mientras que las FMO desempeñarían una función menor (MADAN Y OTROS, 1993).

En este sentido, uno de los estudios realizados para determinar las características farmacodinámicas y farmacocinéticas del DETC-MeSO pone de manifiesto que cuando las ratas fueron pretratadas con disulfirán la máxima concentración en plasma de este metabolito se dio dos horas después de la administración y, todavía era detectable, a las ocho horas (HART Y FAIMAN, 1994). Cuando el tratamiento se realizó con algunos metabolitos del disulfirán, como por ejemplo el DDTC o el DDTC-Me, a las dos horas el DETC-MeSO también era detectable (HART Y FAIMAN, 1994, YOURICK Y FAIMAN, 1989; HART Y OTROS, 1990).

En este intervalo de dos horas se produce también la máxima inhibición de la ALDH dos horas después de su administración, la cual se mantuvo en un 30% 168 horas después de la mencionada administración. Así, las ratas pretratadas con el metabolito y después con etanol presentaron un aumento significativo de los niveles de AcH en sangre similares a los obtenidos cuando el tratamiento se realizó con disulfirán.

Por otra parte, en ratas pretratadas con DETC-MeSO (10.3 mg/kg) y ocho horas después con etanol (1 g/kg) i.p., el pico máximo de AcH se obtuvo en los 30 minutos siguientes a este tratamiento (HART Y FAIMAN, 1994).

En relación con esto, los estudios *in vitro* (0.75  $\mu$ M) indicaron que la máxima inhibición se consigue también dos horas después de la administración del DETC-MeSO (HART Y FAIMAN, 1994).

A modo de conclusión cabría señalar que, en general, para que uno de los metabolitos del disulfirán sea considerado una especie química activa, la ALDH mitocondrial de baja Km de hígado de rata, debería ser inhibida tanto *in vivo* como *in vitro* y, dado que solo el disulfirán y el DETC-MeSO inhiben la ALDH *in vivo* e *in vitro*, mientras que el DDTC, el DDTC-Me y el DETC-Me son inhibidores efectivos solo *in vivo*, se podría plantear que ya que este metabolito es un potente inhibidor tanto *in vivo* como *in vitro* es también por ello el agente químico activo al que debe transformarse el disulfirán para ejercer su efecto sobre la ALDH mitocondrial hepática de baja Km (HART Y FAIMAN, 1992, 1994; MADAN Y OTROS, 1993).

Así, el conjunto de datos indicaría que el DECT-MeSO es la especie química en la que debe bioactivarse el disulfirán para que ejerza su acción y es el metabolito más probable responsable de la inhibición de la ALDH mitocondrial de baja Km *in vivo* (HART Y FAYMAN, 1992, 1994; MADAN Y OTROS, 1993; MADAN Y FAIMAN, 1994a, b).

Cuadro 4. Efecto inhibitorio del disulfirán y sus metabolitos sobre la actividad de la ALDH *in vitro* (Substrato: Propionaldehído) (GOEDDE Y OTROS, 1983a)

Inhibición con pH 7.0 (% de control $\pm$ SE)		
Inhibidor (concentración final)	ALDH I	ALDH II
Disulfirán (20 $\mu$ M)	0 $\pm$ 5	100 $\pm$ 3
Dietilditiocarbamate (1 $\mu$ M)	0 $\pm$ 5	17 $\pm$ 7
Disulfido de carbono (10 $\mu$ M)	0 $\pm$ 3	0 $\pm$ 3
Dietilamino (10 $\mu$ M)	91 $\pm$ 10	11 $\pm$ 4



### 3.1.6.- Inhibición de la ALDH eritrocitaria.

Además de la inhibición *in vivo* e *in vitro* que el disulfirán y sus metabolitos ejercen sobre las fracciones mitocondrial, microsomal y citosólica de la ALDH hepática y cerebral – en córtex, subcórtex, médula y cerebelo– (WEINER Y ARDELT, 1984). Existen datos de su acción sobre la ALDH eritrocítica. Así, los resultados existentes indican que los sujetos alcohólicos muestran una actividad de la ALDH en sangre menor que la de los sujetos pertenecientes al grupo control incluso antes del pretratamiento con disulfirán, siendo esta un 39% menor que la encontrada en la sangre de los sujetos control (HELLSTROM Y OTROS, 1983).

Además, el mismo decremento fue observado en la sangre de sujetos pretratados oralmente con disulfirán (400 mg/día) de forma que la actividad de la ALDH disminuyó un 60% respecto a los sujetos del grupo control, durante la primera semana de tratamiento (HELLSTROM Y OTROS, 1983). Esta inhibición se mantuvo una semana después de retirar el tratamiento.

En la línea de estos datos se encuentran aquellos que utilizando AcH como sustrato obtienen, tras la administración de disulfirán, una inhibición casi completa de la actividad de la ALDH en sangre (HELANDER Y TOTTMAR, 1986). Otros autores han obtenido este efecto por parte del monómero reducido del disulfirán, el DDTC. Indicando que ambos, disulfirán y DDTC, fueron más selectivos para la inhibición de la ALDH eritrocitaria, que es similar a la ALDH citosólica de alta  $K_m$  (HELANDER Y JOHANSSON, 1989). Sin embargo, el DDTC fue menos potente que el DDTC-Me y originó una inactivación similar de las actividades de la ALDH eritrocitaria y de la de los leucocitos (HELANDER Y JOHANSSON, 1989).

### 3.1.7.- Otros tipos de ALDH.

Por otra parte, se ha informado de que tanto el disulfirán como el DDTC-Me inhiben *in vitro* la ALDH de la levadura (VEVERKA Y OTROS, 1997). La utilización de este tipo de ALDH es válida porque aunque solo tiene una homología del 60-70% con otras ALDH de mamíferos, el lugar activo es similar en un 95-100% (SAIGAHL Y OTROS, 1991).

En este sentido, los datos indican que la inhibición por el disulfirán *in vitro* implica la oxidación del lugar activo mientras de la de su metabolito, el DDTC-Me, forma un aducto covalente con la proteína *in vitro* dando lugar al cese de la actividad enzimática (VEVERKA Y OTROS, 1997).

### 3.1.8.- Evidencia de la respuesta etanol-disulfirán (RED).

Como se ha mostrado anteriormente, el disulfido tetraetilthiurán o Antabuse<sup>®</sup> es ampliamente utilizado en la clínica para el tratamiento del alcoholismo ya que la droga hace al paciente sensible al alcohol etílico, aunque el mecanismo subyacente por el cual esta sustancia genera una RED no se conoce demasiado.

Muchos estudios realizados han tratado de determinar la similitud entre los efectos de la interacción entre disulfirán y etanol –la conocida RED– o simplemente la existencia en mayor o menor grado de esta RED tras la administración conjunta o combinada de algunos de los metabolitos del disulfirán y el etanol.

Los resultados obtenidos indican que tanto el disulfirán como sus metabolitos producen una RED, aunque con diferentes intensidades, después de su interacción con el etanol. A modo de ejemplo, esta reacción se observó en ratas pretratadas con disulfirán, DDTC, DDTC-Me (JOHANSSON Y OTROS, 1989; YOURICK Y FAIMAN, 1989), con DETC-Me (HART Y OTROS, 1990) o con DETC-MeSO (MADAN Y FAIMAN, 1994b). Sin embargo, una serie de aspectos, entre los que cabría destacar, por una parte, la no detección de disulfirán, después de su administración, en niveles medibles en los fluidos corporales y, por otra parte, el isozima mitocondrial de baja Km, ALDH<sub>2</sub>, responsable del metabolismo *in vivo* del AcH derivado del etanol es más insensible *in vitro* que *in vivo* a la acción del disulfirán, han llevado a la afirmación de que el disulfirán por sí mismo no es responsable de la RED (GESSNER Y GESNNER, 1992).

Basados en estos datos y en otros que indican que las dosis de los metabolitos del disulfirán para producir una RED son para algunos, como el DETC-Me, la cuarta parte de la utilizada para el disulfirán o el DDTC (HART Y OTROS, 1990), algunos autores han

planteado que la RED debería denominarse más correctamente, por ejemplo, reacción etanol-ácido éster metilo dietildithiocarbámico (YOURICK Y FAIMAN, 1987; 1989).

Por otra parte, en relación con el mecanismo químico de la acción de la RED se propuso la producción de un compuesto de base amónica cuaternaria que generaría los efectos tóxicos de la interacción disulfirán más etanol (CASIER Y MERLEVEDE, 1962). Sin embargo, Kitson (1977b) ha planteado que podría deberse a una acumulación de AcH y a la inhibición de la DBH por el DDTC que genera un bloqueo en la síntesis de NE (KITSON, 1977b).

Jensen y Faiman (1986) llevaron a cabo un estudio para determinar si existía algún tipo de correlación entre la RED, –para su evaluación se utilizaron como índices la hipotermia y la hipotensión–, y el AcH en sangre, el etanol y la inhibición de la ALDH hepática. Para ello pretrataron ratas hembra con disulfirán (100 mg/kg i.p.) y posteriormente determinaron la ALDH hepática de alta y baja Km. Los datos indican que no se produjo inhibición de la alta Km y que el efecto inhibitorio sobre la ALDH de baja Km fue significativo 6, 8 y 12 horas después de la administración de disulfirán.

Además, en los animales pretratados con disulfirán que ocho horas después eran tratados con etanol se obtuvo un marcado incremento del AcH en sangre. En cambio en los animales que solo recibieron etanol (1 g/kg) el AcH en sangre fue prácticamente indetectable.

Cabría señalar también que, los niveles máximos de hipotermia e hipotensión se obtuvieron 120 minutos después del tratamiento con etanol. La administración de un bloqueador del receptor de DA, pimozide (0.5 mg/kg i.p.) 60 minutos antes de la administración de etanol, atenuó los niveles de hipotermia y de hipotensión. Para estos autores, el comienzo y la duración de la hipotermia y de la hipotensión durante la RED, estaría en función del aumento y caída del etanol en sangre más que del AcH en sangre.

Sin embargo, en relación con este punto existen opiniones contrarias, así, Tottmar y Hellstrom (1979) afirman que ambos índices estarían en función de los niveles de AcH.

Posteriormente se ha visto que la intensidad de la RED correlaciona estrechamente con el nivel en sangre de AcH (YOURICK Y FAIMAN, 1989; GESSNER, 1993) ya que el principal efecto del AcH sobre el aparato cardiovascular es la disminución de la resistencia periférica.

Cada vez se ve con más claridad que además de la acumulación de AcH, tras el tratamiento con disulfirán u otros inhibidores de la ALDH, otros aspectos tienen una contribución muy pequeña al tratamiento del alcoholismo (LINDROS Y OTROS, 1981b) ya que lo que estos compuestos tienen en común es que sensibilizan el organismo al alcohol por ser potentes inhibidores de la ALDH (KITSON, 1977a; LINDROS, 1978).

En función de esto, los caminos que lleven a disminuir los niveles de AcH posibilitarían una disminución en el estrés cardiovascular observado tras el tratamiento con, por ejemplo, disulfirán. En este sentido, compuestos como la penicilamina (NAGASAWA Y OTROS, 1977) y el metabisulfito sódico (ERZIELEV, 1973) que atrapan el AcH en el organismo de forma eficaz podrían ser útiles.

Por otra parte, las RED que requieren intervención médica son muy escasas en la actualidad. Sin embargo, si ocurren el tratamiento de elección suele ser la administración de 4-MP (INOUE Y OTROS, 1985; GESSNER, 1993), un inhibidor de la ADH. Este agente no solo disminuye el AcH sino que también alivia las respuestas cardiovasculares presentes tanto en los sujetos control como en los experimentales (STOWELL Y OTROS, 1980; LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985).

Una estrategia alternativa podría ser la administración de ácido ascórbico. En este sentido se ha demostrado que la administración a ratas de este ácido en grandes dosis (2 mmol/kg) disminuye significativamente la mortalidad inducida por AcH (SPRINCE Y OTROS, 1974; 1979).

Otras sustancias como la L-cisteína, el ácido cistéico, la tiamina y el metabisulfito sódico han mostrado que antagonizan significativamente la mortalidad inducida por AcH en ratas (SPRINCE Y OTROS, 1974; 1979).

### **3.1.9.- Otros efectos.**

También se han observado otros efectos, directos o indirectos, diferentes a la inhibición de la ALDH, por parte del disulfirán y algunos de sus metabolitos.

En este sentido, la administración crónica de disulfirán afectó a los enzimas microsomales hepáticos, por ejemplo, deprimiendo los niveles de citocromo P-450 (ZEMAITIS Y GREENES, 1976). Tanto el disulfirán como el DDTC disminuyeron la cantidad de citocromo p-450, siendo el DDTC más potente en esta acción.

Por otra parte, ambos compuestos tuvieron un efecto aditivo al del fenobarbital aumentando la actividad de la NADPH-citocromo c reductasa (LANG Y OTROS, 1976).

Otra de las acciones o efectos de la ALDH es su implicación en el metabolismo de las catecolaminas, por su parte, el disulfirán y el cloral hidrato inhiben esta reacción en el hígado y en el cerebro (BERGER Y WEINER, 1977).

Como ya se ha expuesto, la inhibición de la ALDH por disulfirán conduce a la acumulación de AcH y a la inhibición de la DBH por el DDTC, generando el bloqueo de la síntesis de NE (KITSON, 1977b). De hecho, algunos autores (COLLIER, 1972; MYERS Y MELCHIOR, 1975) defienden que las catecolaminas están implicadas en la ingesta de etanol. Así, según estos autores, el disulfirán bloquearía la ingesta de etanol no por inhibir la ALDH sino por inhibición de la DBH ante lo cual el tratamiento debería enfocarse hacia la DBH y no hacia la ALDH.

En este sentido están orientados los resultados obtenidos en un experimento realizado para comparar la eficacia de la acción de un inhibidor de la DBH y/o de la ALDH en la supresión de la conducta de ingesta de etanol (AMIT Y OTROS, 1976). Así, se sugiere que la inhibición de la DBH puede ser, al menos parcialmente, responsable de la supresión de la ingesta de etanol tras la administración de disulfirán, es decir, que la eficacia del disulfirán como agente antialcohólico se debe, al menos en parte, a su habilidad para inhibir la DBH y, en relación con esto, la interrupción de la síntesis de catecolaminas podría ser un método más efectivo en la supresión del consumo de etanol.

Esto además se apoya en el hecho de que la administración de cianamida, que solo inhibe la ALDH y no la DBH, no tuvo un efecto significativo sobre la ingesta de etanol. Por otra parte, el FLA-63, un inhibidor de la DBH, aumentó en menor grado los niveles de AcH en sangre comparándolo con el disulfirán y el CC, pero al mismo tiempo tuvo un efecto mayor sobre la ingesta voluntaria de etanol.

Los resultados sugieren que el FLA-63 suprime la ingesta de etanol por un mecanismo diferente del mecanismo de la elevación de los niveles de AcH, posiblemente a través de su inhibición de la DBH.

En el siguiente párrafo se hace una mención particular a los efectos reforzantes obtenidos con estas sustancias ya que ha sido la existencia de esos efectos los que de alguna manera han motivado la utilización del DDTC como inhibidor de la ALDH en una de las fases experimentales que conforman esta Tesis Doctoral.

### **3.1.10.- Efectos conductuales reforzantes.**

Se han obtenido datos que indican diferencias en los niveles de AcH en sangre entre sujetos alcohólicos y no alcohólicos (KORSTEN Y OTROS, 1975). Otros datos indican que bajo el tratamiento con disulfirán la ingesta de pequeñas cantidades de etanol produjo efectos de intoxicación y euforia sin experimentar ningún efecto aversivo. Se han obtenido resultados similares a partir de los informes de alcohólicos que indicaron que con el consumo de pequeñas cantidades de alcohol mientras eran tratados con disulfirán obtenían las mismas sensaciones que experimentaban cuando consumían grandes cantidades de etanol (CHEVENS, 1953). En otro estudio se obtuvo que los sujetos que eran tratados con CC más que un decremento en el deseo de consumir alcohol experimentaban un aumento en el deseo de ingerir más alcohol (PEACHEY Y OTROS, 1980).

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio para examinar sistemáticamente si pequeñas dosis de etanol podrían generar cambios en el humor o la euforia si los sujetos eran pretratados con disulfirán o CC (BROWN Y OTROS, 1983). En este estudio, sujetos no alcohólicos eran pretratados con disulfirán y CC. Ocho horas después de este tratamiento fueron expuestos a la ingesta de diferentes dosis de etanol. Los sujetos de ambos grupos experimentales, –los pretratados con disulfirán o los pretratados con CC–, informaron de cambios significativos en el humor. Estos sujetos tienden a sentirse menos serios o sobrios, más felices, más alerta, con un pensamiento más claro y más relajados cuando son comparados con los sujetos del grupo control. Además, en los sujetos pertenecientes a los grupos experimentales se observaron incrementos de AcH tres o cuatro veces superiores a los de los sujetos del grupo tratado con placebo. Por otra parte, los informes de los observadores independientes indicaron que fueron capaces de detectar correctamente a los sujetos experimentales en el 80% de los casos.

Estos resultados podrían indicar que la potenciación por parte del disulfirán o la CC de dosis de etanol que solas no producen efecto podría atribuirse a los niveles aumentados de AcH en sangre.

Además, también otros autores (BEHAR Y OTROS, 1983) han presentado datos de que el incremento inducido por etanol en el humor correlaciona positivamente con los niveles de AcH en sangre.

En conjunto, los datos de estos experimentos, ponen de manifiesto la posible implicación del AcH cerebral en estos efectos reforzantes del etanol. Esta idea se apoya en los resultados obtenidos en experimentos con animales.

En este sentido, en ratas se ha obtenido que mientras que inyecciones i.p. de AcH indujeron un CAS no se obtuvo ese efecto cuando el AcH fue directamente inyectado en los ventrículos cerebrales (BROWN Y OTROS, 1978). De hecho, se ha demostrado que las ratas podían aprender a realizar una tarea operante para recibir microinfusiones de AcH (BROWN Y OTROS, 1979). Por otra parte, el rango de autoadministración de AcH también se correlacionó con la preferencia posterior por el etanol (BROWN Y OTROS, 1980).

Además, el consumo voluntario de etanol se ha correlacionado con la actividad de la ALDH en ratas (AMIR, 1978a, b; SOCARANSKY Y OTROS, 1984; 1985). Estos resultados sugieren que el AcH, además de sus efectos periféricos aversivos, puede generar efectos reforzantes centrales que pueden estar en la base de la iniciación y el mantenimiento del consumo de etanol.

A modo de resumen, se podría afirmar que los datos presentados, a partir de trabajos con animales y humanos, indican que bajo determinadas condiciones los inhibidores de la ALDH no generan efectos aversivos en la ingesta de etanol y lo que es más importante, en sujetos humanos el Temposil® y el Antabuse® pueden aumentar los efectos eufóricos del alcohol cuando este se consume en pequeñas cantidades.

Así, en función de los resultados que se desprenden de la revisión de la literatura realizada, se planteó el diseño y la realización de una serie de experimentos, mediante la administración del DDTC, uno de los metabolitos del disulfirán, encaminados, por una parte, a determinar la función del enzima ALDH cerebral en el metabolismo del AcH y, por otra, a aportar nuevos datos sobre la mediación del AcH central en los efectos psicofarmacológicos inducidos por el etanol.

A continuación se presentan estos experimentos y los resultados obtenidos a partir de ellos.

### **3.2.- Experimentos.**

#### **3.2.1.- Experimento n° 7.**

##### **Efecto de diferentes dosis del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por etanol.**

###### *Objetivos.*

Los objetivos del presente experimento fueron dos. El primero determinar si el DDTC a diferentes dosis poseía, por sí mismo, algún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los animales en el campo abierto. Y, el segundo, determinar el efecto de diferentes dosis de DDTC sobre la actividad locomotora inducida por una dosis aguda de etanol.

Así, este primer experimento recoge el estudio de la respuesta de dosis del DDTC sobre la actividad locomotora de los ratones en un campo abierto.

###### *Hipótesis.*

Las hipótesis para este experimento fueron las siguientes.

1- La administración de diferentes dosis de DDTC no producirá ningún efecto sobre la deambulación espontánea de los animales.

2- La acción del DDTC sobre la actividad locomotora inducida por etanol provocará una inhibición de esa conducta que será dependiente de la dosis de DDTC utilizada.

###### *Procedimiento experimental.*

Para este experimento fueron utilizados 64 ratones macho de las características descritas anteriormente en el apartado de materiales y método.

Los animales fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimental o control, estando formado cada uno de ellos por 32 animales. Cada uno de los grupos contaba con cuatro niveles distintos; integrados por ocho animales que fueron asignados a los diferentes niveles dentro de cada grupo.



Los animales fueron pretratados con inyecciones i.p. de diferentes dosis del inhibidor DDTC. Las dosis utilizadas fueron las cuatro siguientes: 0, 114, 228 y 456 mg/kg. El volumen de inyección para la dosis 0 mg/kg de DDTC se obtuvo calculando una cantidad de salina equivalente a la dosis 228 mg/kg de DDTC.

El rango de dosis utilizado se planteó a partir de la dosis 114 mg/kg que como ya se ha visto (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991; JIN Y OTROS, 1994; HART Y FAIMAN, 1994) ha sido la utilizada en los estudios *in vivo* para determinar las características de este metabolito del disulfirán.

Las dosis restantes (228, 456 mg/kg) se determinaron mediante una progresión geométrica a partir de la dosis de 114 mg/kg.

Tras un intervalo de ocho horas, todos los animales tanto los pertenecientes al grupo experimental como los del grupo control, recibieron una inyección i.p. de solución salina. Tras este tratamiento y un intervalo de cinco minutos, los animales que integraban el grupo experimental recibieron una inyección de etanol a una dosis de 2.4 g/kg, mientras que los pertenecientes al grupo control eran nuevamente inyectados con salina.

El mencionado intervalo temporal de ocho horas entre ambas inyecciones, por una parte, el pretratamiento con DDTC y, por otra, el posterior tratamiento con etanol, se utilizó a partir de los resultados obtenidos por otros autores; teniendo en cuenta que la aplicación de un intervalo de ocho horas, tanto en animales (YOURICK Y FAIMAN, 1989; HART Y OTROS, 1990; HART Y FAIMAN, 1992) como en sujetos humanos (BROWN Y OTROS, 1983), indicó que tanto el disulfirán como sus metabolitos, -DDTC, DDTC-Me sulfoxide, DDTC-MeSO, entre otros-, demostraban un equilibrio en el efecto inhibitor sobre la ALDH mitocondrial de baja  $K_m$  ocho horas después de la administración de las mencionadas sustancias (YOURICK Y FAIMAN, 1989; MADAN Y FAIMAN, 1994b; 1995).

Este protocolo se plantea con tres fases; la primera integrada por el pretratamiento con DDTC, la segunda por la administración de solución salina y, la tercera consistente en el tratamiento con etanol. Estas tres fases son necesarias ya que, como se expondrá posteriormente, para la realización de los estudios en los que se de el pretratamiento combinado de diferentes sustancias, en ese caso de DDTC y 4-MP, se necesitan tres inyecciones (experimentos n° 9 y n° 10), de forma que la no aplicación de un protocolo similar en estos estudios conductuales sería una variable que podría influir en la interpretación de los resultados obtenidos dificultando las conclusiones alcanzadas.

*Resultados.*

En la figura 7, se recogen los resultados del efecto de las diferentes dosis de DDTC en la actividad locomotora espontánea y su acción sobre la actividad locomotora inducida por una inyección aguda de etanol (2.4 g/kg) en ratones.

Para realizar el análisis de los datos se llevó a cabo una prueba de ANOVA con el GRUPO y las DOSIS como factores entre sujetos. El factor grupo presentaba dos niveles (etanol-salina) y el factor dosis presentaba cuatro niveles, uno por cada dosis de inhibidor (0, 114, 228 y 456 mg/kg de DDTC).

El análisis realizado mostró un efecto estadísticamente significativo para la INTERACCIÓN (grupo x dosis), así como para el efecto GRUPO y para el efecto DOSIS, obteniéndose los siguientes valores de F:

Dosis	F (3,56) = 3.680	p < 0.017
Grupo	F (1,56) = 27.122	p < 0.000
Interacción	F (3,56) = 4.971	p < 0.004

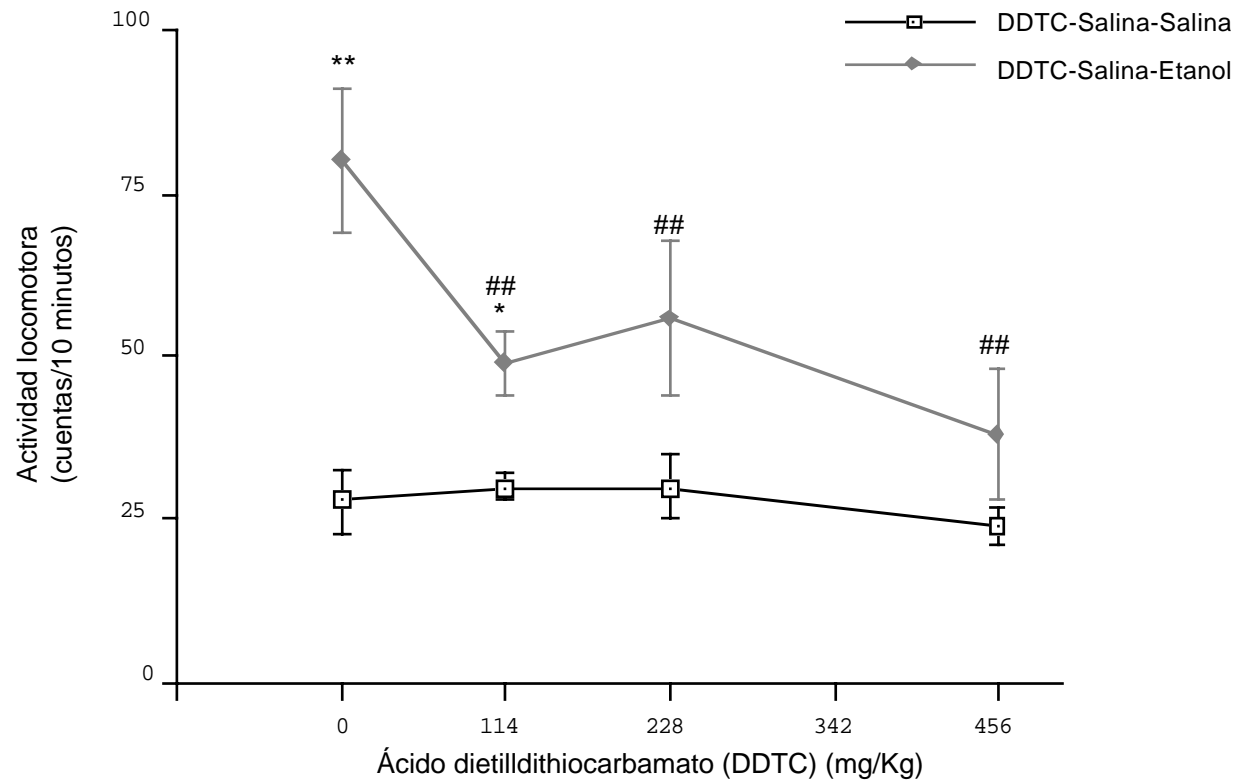
Posteriormente, se aplicó un análisis *a posteriori* de la interacción entre los dos factores. La prueba estadística utilizada fue el test LSD de Fisher.

Como puede observarse en la figura 7, en el grupo tratado con solución salina no se obtuvieron diferencias significativas, lo cual indica que el pretratamiento con el inhibidor DDTC a ninguna de las dosis utilizadas tiene por sí mismo un efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones.

Para la determinación de posibles diferencias estadísticas entre las dosis del inhibidor en su interacción con el etanol se realizó una prueba *post hoc* LSD de Fisher, encontrando diferencias entre la dosis 0 mg/kg de DDTC y las restantes dosis del mencionado inhibidor (114, 228 y 456 mg/kg).

La figura 7 también muestra que la inhibición que el DDTC ejerce sobre la actividad locomotora inducida por el etanol es dependiente de la dosis de inhibidor administrada.

Así, conforme se aumenta la dosis del inhibidor aumenta también el grado de inhibición que este posee sobre la conducta inducida por el etanol.



**Fig. 7:** Efecto de diferentes dosis de ácido dietildithiocarbamato (DDTC) sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg) ocho horas antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05 para las diferencias entre los grupos DDTC-salina y DDTC-etanol; ##p < 0.01 para las diferencia entre el grupo salina-etanol y el grupo DDTC-etanol).



### *Discusión.*

En este primer experimento se estudiaron los efectos que diferentes dosis de DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg) pudieran tener sobre la actividad locomotora espontánea de ratones en un campo abierto, así como sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

En este sentido, los resultados obtenidos indican que el pretratamiento con el DDTC antagoniza, en función de la dosis administrada, los efectos psicomotores inducidos por el etanol en la actividad locomotora de los ratones. Mostrando un efecto dependiente de la dosis de inhibidor sobre dicha actividad, de forma que se produce mayor inhibición en la conducta en función del aumento en la dosis del inhibidor.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por otros autores (MADAN Y FAIMAN, 1994b; HART Y FAIMAN, 1994) que obtuvieron que el pretratamiento con disulfirán o alguno de sus metabolitos provoca una inhibición de la ALDH ocho horas después de la aplicación del tratamiento.

En este sentido y dado que el pico máximo en la concentración de AcH en sangre se obtiene entre media hora y dos horas después de la administración del etanol (HART Y FAIMAN, 1994; MADAN Y FAIMAN, 1995), se podría afirmar que este acúmulo de AcH en la periferia del organismo mediante la toxicidad que genera es el responsable de la disminución de la actividad locomotora obtenida en este experimento.

Por otra parte, aunque los resultados obtenidos por otros autores para la dosis 114 mg/kg (DEITRICH Y ERWIN, 1971) indican un efecto inhibitor, los resultados del presente experimento, obtenidos del análisis de las diferencias entre los grupos, experimental y control, mediante la prueba *post hoc* LSD de Fisher, mostraron diferencias para las dosis 0 y 114 mg/kg.

Esto indica, por una parte, el efecto del etanol sobre la actividad locomotora de los ratones y, por otra, que las dosis menores del inhibidor (114 mg/kg) aunque muestran diferencias respecto a la dosis 0 mg/kg de DDTC, el nivel de inhibición que ejercen no es lo suficientemente elevado como para que los efectos del etanol estén totalmente anulados y no se den diferencias entre el grupo experimental y el control para la mencionada dosis.

En función de lo anterior, estos datos estarían más en consonancia con los que muestran que aunque se produce una inhibición por parte del DDTC a la dosis de 114

mg/kg, el nivel más elevado que alcanzó fue del 65% (YOURICK Y FAIMAN, 1989; HART Y FAIMAN, 1994).

A modo de resumen, se podría afirmar que el DDTC ejerce *in vivo* un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por etanol que es dependiente de la dosis de inhibidor utilizada.

### **3.2.2.- Experimento n° 8.**

#### **Efecto de la administración aguda de DDTC en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.**

##### *Objetivos.*

Este experimento fue realizado con la finalidad de establecer, por una parte, el estudio de la respuesta a diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg) de los ratones en actividad locomotora medida en un campo abierto y, por otra, el efecto que el DDTC (228 mg/kg) posee sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones.

##### *Hipótesis.*

Las hipótesis de este experimento son las siguientes:

1- El etanol ejercerá un efecto bifásico sobre la locomoción de los ratones en un campo abierto. Así, dosis moderadas inducirán un aumento en la actividad locomotora mientras que las dosis más altas producirán un efecto depresor sobre la misma.

2- El DDTC, a la dosis utilizada, tendrá un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

##### *Procedimiento experimental.*

Para la realización de este estudio se tomaron 96 animales que fueron divididos en dos grupos, el experimental y el control, estando formado cada uno de ellos por 48 ratones. Los seis niveles que componían cada uno de los grupos estaban a su vez integrados por ocho animales cada uno.

Los animales, después de una semana de habituación a las condiciones de estabulario, fueron pesados y asignados al azar a uno de los dos grupos –experimental o control–.

Así, los ratones pertenecientes al grupo experimental fueron pretratados con inyecciones i.p. de una dosis de 228 mg/kg del inhibidor DDTC. Tras un intervalo temporal de ocho horas eran pretratados nuevamente con una inyección i.p. de salina y cinco minutos después fueron tratados con las diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg) también mediante una administración i.p. Media hora después del tratamiento con etanol los ratones eran situados en el aparato de campo abierto durante un intervalo de veinte minutos de los cuales se registraba la actividad locomotora de los diez últimos minutos del mencionado intervalo temporal.

Durante el tiempo transcurrido entre los diferentes tratamientos así como en el tiempo transcurrido desde la última inyección hasta la medida de la actividad locomotora los animales fueron alojados de nuevo en sus jaulas.

Por otra parte, cabría comentar que aunque en investigaciones anteriores se realizaron los análisis con la dosis de 114 mg/kg (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991; JIN Y OTROS, 1994; HART Y FAIMAN, 1994), para este experimento la dosis de DDTC utilizada fue la de 228 mg/kg, que es el doble de la utilizada anteriormente. Se seleccionó la dosis de 228 mg/kg en función de los datos obtenidos en el experimento n° 7, en el que se obtuvo que el efecto inhibitorio más claro, sobre la actividad locomotora inducida por etanol, se logró mediante esta dosis. Las diferencias entre las dosis se podrían deber a las diferentes especies de roedores utilizados en estos experimentos.

En cuanto a los intervalos temporales utilizados en el presente experimento, el transcurso de ocho horas tras la administración del inhibidor DDTC fue seleccionado en función de experimentos anteriores en los que se había demostrado que es, por una parte, el momento en el que esta droga ejerce la máxima inhibición de la ALDH mitocondrial hepática de baja Km (YOURIK Y FAIMAN, 1989) y, por otra, el intervalo de tiempo necesario para que tanto el disulfirán como sus metabolitos ejerzan el mismo nivel de inhibición sobre el mencionado isozima de ALDH tanto en animales (JENSEN Y FAIMAN, 1986; HART Y OTROS, 1990; HART Y FAIMAN, 1992; 1994; MADAN Y FAIMAN, 1994b; 1995) como en humanos (BROWN Y OTROS, 1983).

Por otra parte, la latencia de media hora entre el tratamiento con etanol y la actividad locomotora fue seleccionada sobre la base de estudios previos en los que se observa que la



máxima concentración de AcH, tras una inyección de etanol, se da media hora después de ese tratamiento (LINDROS Y OTROS, 1981a; YOURIK Y FAIMAN, 1989; HART Y FAIMAN, 1994).

Cabe señalar también que los cinco minutos que transcurren entre el pretratamiento con salina y la inyección de etanol se mantienen como control de otros experimentos que también forman parte de esta Tesis Doctoral y que fueron seleccionados de acuerdo con los resultados obtenidos en diferentes estudios piloto realizados con anterioridad a estos experimentos.

Por su parte, los animales pertenecientes al grupo control fueron pretratados con una inyección i.p. de salina, el volumen inyectado de solución salina fue calculado como si se inyectara el volumen de una dosis de 2.4 g/kg de etanol. Ocho horas después recibían otra inyección de solución salina y tras cinco minutos recibían el tratamiento con las diferentes dosis de etanol. Media hora más tarde eran situados individualmente en el campo abierto para el registro de la actividad locomotora.

### *Resultados.*

En la figura 8 se recogen los resultados del efecto de diferentes dosis de etanol sobre la actividad locomotora en ratones así como el efecto del inhibidor DDTC sobre la mencionada actividad.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante una prueba de ANOVA con el GRUPO y las DOSIS como factores entre sujetos. El factor grupo presentaba dos niveles (DDTC-salina) y el factor dosis presentaba seis niveles (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

El análisis realizado mostró un efecto significativo para el efecto DOSIS, obteniéndose los siguientes valores de F:

Dosis	$F(5,84) = 6.1801$	$p < 0.00$
Grupo	$F(1,84) = 3.6937$	$p < 0.06$
Interacción	$F(5,84) = 2.0235$	$p < 0.08$

Tras este análisis, se realizaron las pruebas *a posteriori* de Fisher y, como puede observarse en la figura 8, el etanol produce una respuesta bifásica de excitación y depresión de la actividad locomotora.

Las dosis que presentan diferencias significativas son:

- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0 y 3.2 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 3.2 g/kg de etanol.
- 1.6 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.
- 3.2 y 4 g/kg de etanol.

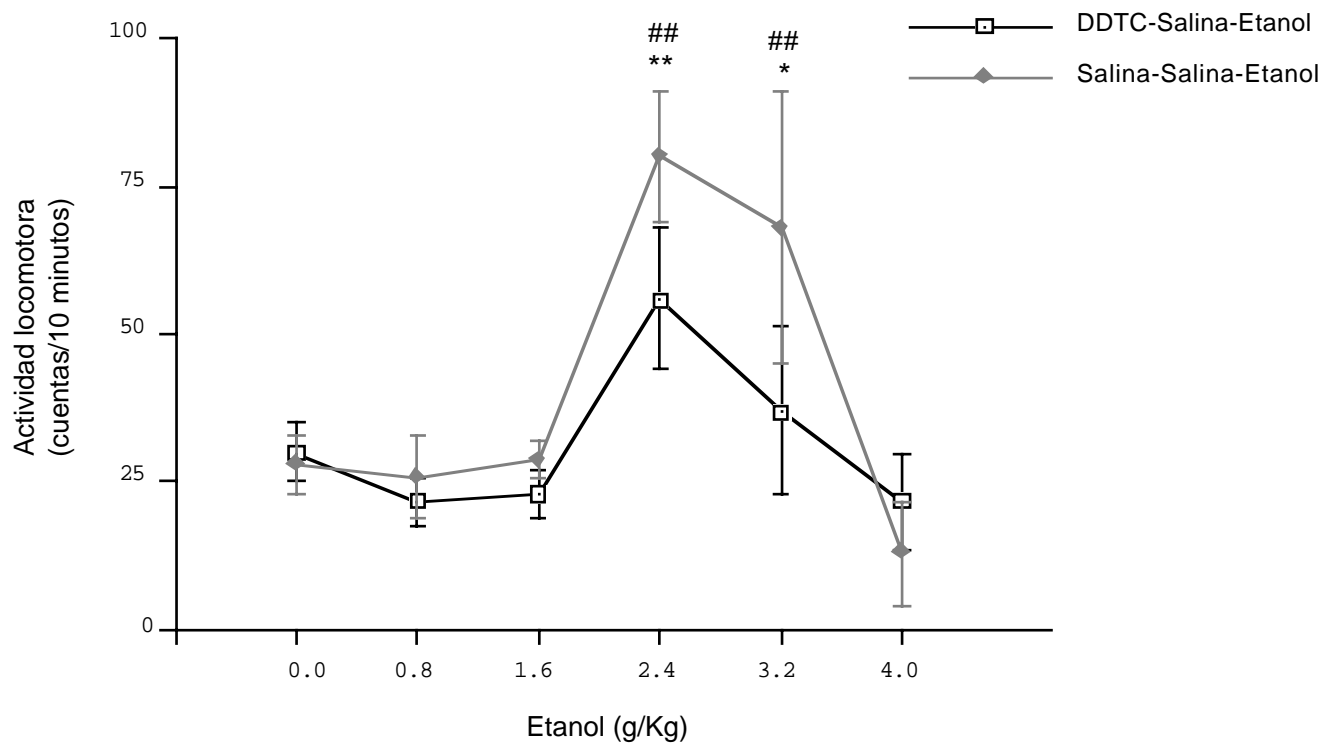
Existe, por tanto, un efecto sobre la actividad locomotora dependiente de la dosis de etanol utilizada, de forma que dosis moderadas de etanol (2.4 y 3.2 g/kg) inducen un aumento en la actividad locomotora y dosis altas (4 g/kg) producen un efecto depresivo sobre la misma.

Respecto al grupo experimental, en la figura 8, se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis de etanol en su interacción con el inhibidor. Esta reducción de la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol permite afirmar que el DDTC ejerce una acción depresora sobre los efectos psicomotores del etanol en ratones.

Para determinar las posibles diferencias en cuanto a la interacción entre los grupos experimental y control, se realizó una prueba *post hoc* LSD de Fisher, obteniendo estas diferencias significativas para las dosis 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.

Los resultados referidos a la interacción entre los grupos indicarían que las curvas obtenidas en actividad locomotora presentan diferencias estadísticamente significativas.

En conjunto estos resultados permitirían afirmar, por una parte, que el etanol ejerce un efecto bifásico sobre la actividad locomotora de los ratones en un campo abierto y, por otra, que el DDTC, a la dosis utilizada (228 mg/kg), anula el mencionado efecto.



**Fig. 8:** Efecto de la administración del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) o salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con DDTC (228 mg/kg) o salina ocho horas antes del tratamiento con diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p< 0.01; \*p< 0.05 para las diferencias entre los grupos salina-etanol y DDTC-etanol; ##p< 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol).

### *Discusión.*

Como se ha visto el etanol ejerce sobre la actividad locomotora medida en un campo abierto una acción bifásica que englobaría una parte inductora de la conducta y una parte depresora de la misma.

Ante esta acción del etanol la administración del DDTC ejerce un efecto interactivo de carácter antagonista inhibiendo el aumento de la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.

En este sentido, los resultados indican que el DDTC, posiblemente mediante la inhibición que ejerce sobre la ALDH genera un aumento de AcH en la periferia del organismo que inhibe la expresión de la acción bifásica que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora en ratones.

Trabajos anteriores han demostrado la acción inhibitoria sobre la actividad de la ALDH, más concretamente del isozima ALDH mitocondrial de baja Km, por parte del disulfirán y sus metabolitos (HELLSTRÖM Y TOTTMAR, 1982; HELLSTRÖM Y OTROS, 1983; MACKERELL Y OTROS, 1985; YOURICK Y FAIMAN, 1987; 1989; JOHANSSON Y OTROS, 1989; HART Y OTROS, 1990; HART Y FAIMAN, 1990; VEVERKA Y OTROS, 1997). Esta inhibición provoca una acumulación de AcH en la periferia del organismo (JENSEN Y FAIMAN, 1986; HART Y FAIMAN, 1994), este aumento en la concentración del AcH genera un grado de toxicidad que provoca una serie de efectos desagradables que se conocen con el nombre de RED (YOURICK Y FAIMAN, 1989; MADAN Y FAIMAN, 1995).

Los datos obtenidos en este experimento van en la línea de los trabajos anteriores sugiriendo, por una parte, la acción inhibitoria del DDTC sobre la actividad de la ALDH y, por otra, la presencia de una RED que impide la expresión conductual de la actividad locomotora inducida por etanol.

Así, la sugerencia de la posible existencia de una RED que sea la responsable, mediante las concentraciones aumentadas de AcH en el organismo, de la no expresión conductual del aumento en la actividad locomotora inducida por etanol se fundamenta en estudios previos que han indicado que el pretratamiento con metabolitos del disulfirán previo a la administración de etanol provoca un aumento en la concentración de AcH que

es máximo media hora después de la administración del etanol y dura dos horas (HART Y FAIMAN, 1994; MADAN Y FAIMAN, 1995).

La importancia de este intervalo de media hora se refleja también en los estudios con sujetos humanos (LINDROS Y OTROS, 1981a) en los que la administración de un inhibidor de la ADH, el 4-MP, se realizaba 30 minutos antes del tratamiento con etanol con el objetivo de prevenir los efectos tóxicos del aumento de AcH provocado por el pretratamiento con un inhibidor de la ALDH, la cianamida.

A modo de resumen, cabría señalar que los resultados obtenidos son congruentes con una inhibición de la ALDH por parte del DDTC que provocaría, mediante el aumento de AcH en el organismo, un efecto antagonista sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

### **3.2.3.- Experimento n° 9.**

**El efecto de la administración combinada del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) y el 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol.**

#### *Objetivos.*

Una vez demostrado que el 4-MP administrado agudamente a una dosis de 10 mg/kg no tiene por sí mismo ningún efecto sobre la actividad locomotora inducida por etanol en ratones –ver experimento n° 5–, se realizó el presente experimento con el objetivo de determinar si la acción conjunta de dos de los enzimas implicados en el metabolismo del etanol como son la ADH y la ALDH ejercería un efecto significativo sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Como ya se indicó el primero de estos enzimas regula el paso de etanol a acetaldehído en la periferia del organismo (PETERSEN Y OTROS, 1983) mientras que la ALDH regula el paso de AcH a acetato, tanto a nivel periférico como a nivel central (LIEBER, 1977; EHRIG Y OTROS, 1990).

### *Hipótesis.*

1- La hipótesis de partida para este experimento es que el acúmulo de AcH en la periferia del organismo, producido por la inhibición de la ALDH periférica generada por la administración de DDTC, se atenuará mediante la inhibición del enzima ADH debido a la acción del 4-MP, de forma que esta atenuación de los niveles de AcH periféricos permita la observación del aumento que el etanol genera sobre la actividad locomotora de los ratones.

2- Por otra parte, y dado que la acción de la acción de la ADH en el cerebro, sobre el metabolismo del etanol, es mínima (RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972), se podría observar, en los ratones, un aumento en la actividad locomotora inducida por etanol superior a la obtenida para los animales pertenecientes al grupo control ya que la concentración de AcH a nivel central estaría aumentada debido a la inhibición de la ALDH encefálica por parte del DDTC.

### *Procedimiento experimental.*

En este experimento se emplearon 96 ratones macho de las características descritas previamente en el apartado de materiales y método.

Los animales, después de ser pesados, fueron asignados a los grupos, experimental y control, de forma que cada grupo estuvo compuesto por 48 animales que a su vez fueron asignados a cada uno de los seis niveles que componían los grupos, a razón de ocho animales por nivel.

Los ratones pertenecientes al grupo experimental recibieron una inyección aguda de DDTC, a una dosis de 228 mg/kg, y ocho horas después fueron pretratados con una inyección de 4-MP, a una dosis de 10 mg/kg. Cinco minutos después de esta inyección, recibieron el tratamiento con las distintas dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Después de cada una de estas intervenciones los animales fueron situados nuevamente en sus jaulas hasta el momento de la realización de la prueba conductual.

Tras la inyección de etanol y transcurrido un intervalo temporal de media hora los animales eran situados individualmente en el aparato de campo abierto para su posterior evaluación.

Por su parte, los animales pertenecientes al grupo control recibieron un pretratamiento con una inyección aguda de solución salina, ocho horas después fueron inyectados con 4-MP (10 mg/kg) y cinco minutos después de esto fueron inyectados con etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Transcurrida media hora a partir de este tratamiento, los animales fueron situados individualmente en el campo abierto para la medida de su actividad locomotora.

### *Resultados.*

La figura 9 recoge el efecto del 4-MP en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol así como el efecto de la interacción entre el DDTC y el 4-MP sobre la mencionada actividad.

Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA con el efecto GRUPO y el efecto DOSIS como factores. El factor grupo estaba compuesto por dos niveles (salina-4-MP-etanol y DDTC-4-MP- etanol) y el factor dosis por seis niveles, uno por cada una de las dosis de etanol utilizadas (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Los resultados obtenidos a partir de este análisis indicaron un efecto estadísticamente significativo tanto para el factor GRUPO, como para el factor DOSIS así como para la INTERACCIÓN entre ambos factores.

Los valores de F que se obtuvieron, fueron los siguientes:

Dosis	$F(5,84) = 21.830$	$p < 0.000$
Grupo	$F(1,84) = 4.019$	$p < 0.048$
Interacción	$F(5,84) = 7.186$	$p < 0.000$

Después de este análisis se realizaron las pruebas *a posteriori* LSD de Fisher, obteniendo que en ambos grupos se da el efecto bifásico que el etanol tiene sobre la actividad locomotora en ratones.

En este sentido, el grupo experimental presentó diferencias para las dosis:

- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0 y 3.2 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

Las diferencias significativas entre dosis para el grupo control fueron las siguientes:

- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0 y 3.2 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 3.2 g/kg de etanol.
- 1.6 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.
- 3.2 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

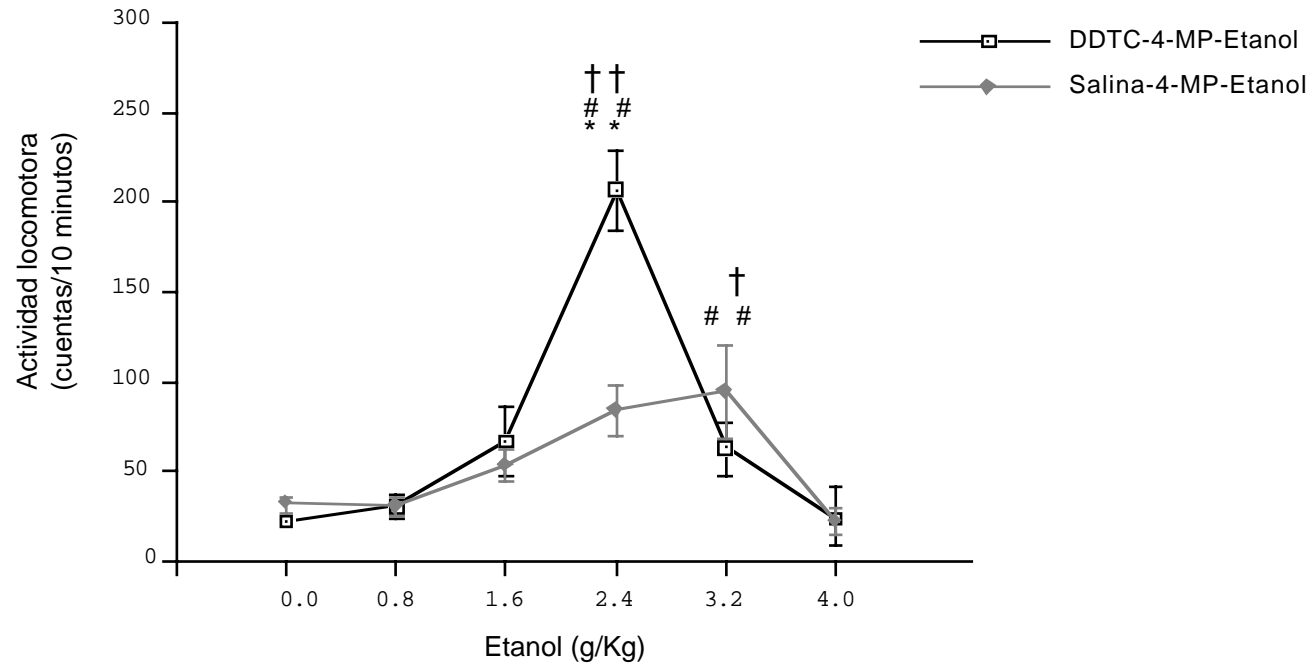
En la figura 9 están representados los resultados de estos análisis y como puede observarse el etanol causa en ambos grupos una curva bifásica de excitación-depresión. Así, se puede afirmar que el etanol a dosis moderadas (2.4 y 3.2 g/kg) produce un aumento en la actividad locomotora mientras que a dosis elevadas (4 g/kg) produce una depresión de la misma.

En cuanto a la significación estadística de la interacción entre ambos grupos, mediante la prueba LSD de Fisher se obtuvo un efecto significativo para la dosis 2.4 g/kg de etanol.

Este último resultado refleja el efecto de la manipulación enzimática realizada mediante los inhibidores de los enzimas implicados en el metabolismo del etanol.



Así, se podría afirmar que la combinación del 4-MP, un inhibidor de la ADH, y del DDTC, un inhibidor de la ALDH, se plasma en un aumento de la actividad locomotora inducida por distintas dosis de etanol que es diferente, desde un punto de vista estadístico, del obtenido cuando la administración de etanol no se acompaña de la combinación de esos dos inhibidores.



**Fig. 9:** Efecto de la administración conjunta del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) y 4-MP o salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con DDTC (228 mg/kg) o salina ocho horas antes del tratamiento con diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p< 0.01 para las diferencias entre los grupos DDTC-4-MP-etanol y salina-4-MP-etanol; ##p< 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol; ††p< 0.01; †p< 0.05 para las diferencias entre los grupos DDTC-4-MP-salina y DDTC-4-MP-etanol)

### *Discusión.*

En este experimento se estudió el efecto de la combinación de dos sustancias que tienen entre sus propiedades la inhibición de algunos de los enzimas implicados en el metabolismo del etanol. En este caso, las sustancias empleadas fueron, por una parte, el 4-MP que ejerce una inhibición eficiente sobre la ADH (THEORELL Y OTROS, 1969) y, por otra, el DDTC del que se conocen sus efectos de inhibición sobre el isozima de ALDH, la ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991).

Por su parte, el 4-MP ha sido ampliamente utilizado como terapia efectiva ante el aumento en las concentraciones de AcH en el organismo (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985), concentraciones que si son elevadas provocan reacciones tóxicas que se conocen como RED, si las genera el disulfirán o alguno de sus metabolitos (YOURICK Y FAIMAN, 1989; KITSON, 1991; MADAN Y FAIMAN, 1994b; 1995), Respuesta etanol-Cianamida (REC), si es generada por la administración de cianamida o de carbimida de calcio (KUPARI Y OTROS, 1983) y Respuesta Etanol-Nitrefazol (REN) si la sustancia que produce el aumento en los niveles de AcH es el nitrefazole (SUOKAS Y OTROS, 1985).

Reflejo de este efecto del 4-MP podrían ser los datos obtenidos en este experimento que indican que la inhibición ejercida por el DDTC sobre la actividad locomotora inducida por etanol (experimento n° 8) no se producen cuando se administran conjuntamente 4-MP (10 mg/kg) y DDTC (228 mg/kg) como tratamiento previo a la administración de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

En este sentido, existen datos que indican que las consecuencias de la acción inhibitoria de otro de los inhibidores de la ALDH, la cianamida, sobre la actividad de la ALDH quedan anuladas o atenuadas mediante el pretratamiento con 4-MP (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b).

Así, el 4-MP (10 mg/kg) anuló la acumulación periférica de AcH en ratas sometidas al tratamiento combinado de 4-MP y cianamida, previo a la administración de etanol (SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b).

En relación con lo anterior, los datos obtenidos en el presente experimento son, por una parte, congruentes con los informes que indican que el 4-MP disminuye o atenúa la

concentración de AcH en el organismo mediante su acción inhibitoria sobre la actividad de la ADH y, por otra, indican la implicación de la ALDH central en la expresión del efecto del etanol sobre la actividad locomotora.

Cabe señalar también que la inhibición que el 4-MP ejerce sobre la ADH periférica tendría a nivel central una repercusión menor dado que la ADH participa mínimamente en el metabolismo central del etanol (RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972). Además, la inhibición que el DDTC ejerce sobre la ALDH genera modificaciones en su actividad tanto periférica (MADAN Y FAIMAN, 1995) como central (FAIMAN Y OTROS, 1980; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982).

De este modo, en función de la acción del DDTC sobre la ALDH se generan concentraciones de AcH por encima de las normales tanto periférica como centralmente. Sin embargo, la acción del 4-MP sobre la ADH permitiría una reducción de los niveles de AcH en la periferia del organismo sin afectar significativamente los niveles centrales de este metabolito.

Estos niveles mayores de AcH obtenidos centralmente mediante la inhibición del isozima ALDH<sub>2</sub> y la participación del 4-MP anulando el AcH periférico actuarían facilitando la expresión conductual de la acción del etanol.

En función de lo anterior, los resultados obtenidos en este experimento permiten sugerir la implicación del AcH central en la mediación de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol, en este caso, podríamos afirmar que el AcH media la acción del etanol sobre la actividad locomotora de ratones en un campo abierto.

#### **3.2.4.- Experimento nº 10.**

**Efecto de la interacción del 4-metilpirazol (4-MP) con diferentes dosis del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por una inyección aguda de etanol en ratones.**

##### *Objetivos.*

Los objetivos en la realización de este experimento fueron, por una parte, determinar si el 4-MP (10 mg/kg) ejercía algún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de ratones pretratados con diferentes dosis del inhibidor DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg) y,

por otra parte, si la actividad locomotora inducida por etanol en animales pretratados con DDTC era modificada significativamente si los animales recibían previamente una inyección aguda de 4-MP.

### *Hipótesis.*

Las hipótesis para este experimento fueron:

1- Al igual que en los experimentos nº 5 y nº 9, se plantea que el 4-MP no ejercerá ningún efecto por sí mismo en la actividad locomotora, en este caso, pese a que los ratones hayan sido pretratados con diferentes dosis de DDTC.

2- La administración conjunta de 4-MP y DDTC, a diferentes dosis, en animales tratados con etanol supondrá cambios en la actividad locomotora que esta droga genera.

### *Procedimiento experimental.*

Se utilizaron 64 ratones macho, asignando aleatoriamente 32 al grupo experimental y 32 al grupo control. Ambos grupos, fueron a su vez divididos en cuatro grupos de ocho animales para cada uno de los niveles analizados.

Los animales del grupo experimental recibieron una inyección i.p. del inhibidor DDTC (0,114, 228, 456 mg/kg) y ocho horas más tarde recibían una inyección i.p. aguda de 4-MP (10 mg/kg). Cinco minutos después de esta eran tratados con una inyección de etanol (2.4 g/kg).

Tras un intervalo de media hora, después de este último tratamiento, eran situados individualmente, en el campo abierto para su evaluación.

En cuanto al grupo control, los animales recibieron la inyección de DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg), ocho horas más tarde eran pretratados con 4-MP y cinco minutos después de esto eran inyectados con solución salina. Transcurrida media hora después de la inyección, eran evaluados en el campo abierto.

### *Resultados.*

*Resultados.*

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 10 donde se puede observar, por una parte, el efecto que sobre la actividad locomotora espontánea de ratones en un campo abierto tiene la interacción de los dos inhibidores, el 4-MP y el DDTC, y, por otra, el efecto de la interacción entre estas dos sustancias sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Se realizó un análisis de la varianza con el GRUPO y las DOSIS como factores entre sujetos. El factor grupo presentaba dos niveles, DDTC-4-MP-etanol y DDTC-4-MP-salina. Por su parte, el factor dosis se componía de cuatro niveles, uno por cada dosis del inhibidor (0, 114, 228 y 456 mg/kg).

Los datos obtenidos a partir de este análisis indicaron un efecto estadísticamente significativo para el factor GRUPO, para el factor DOSIS y para la INTERACCIÓN entre ambos.

Los valores de F que se obtuvieron fueron los siguientes:

Dosis	F (1,56) = 139.3699	p < 0.000
Grupo	F (3,56) = 10.7202	p < 0.000
Interacción	F (3,56) = 12.1102	p < 0.000

Las pruebas *post hoc* de Fisher, realizadas para determinar si existían diferencias en el grupo control entre las diferentes dosis del inhibidor, indicaron que el 4-MP, por sí mismo, no ejerce ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones en un campo abierto ya que no se produjeron cambios estadísticamente significativos en el nivel de actividad entre ninguna de las dosis.

En la figura 10 se muestra el efecto anterior. Así, puede observarse que en el grupo tratado con solución salina no se obtuvieron diferencias significativas, lo cual nos indica que el pretratamiento con el 4-MP a ninguna de las dosis de DDTC utilizadas tiene por sí mismo un efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones.

Por otra parte, en el grupo experimental se obtuvieron diferencias significativas entre las siguientes dosis:

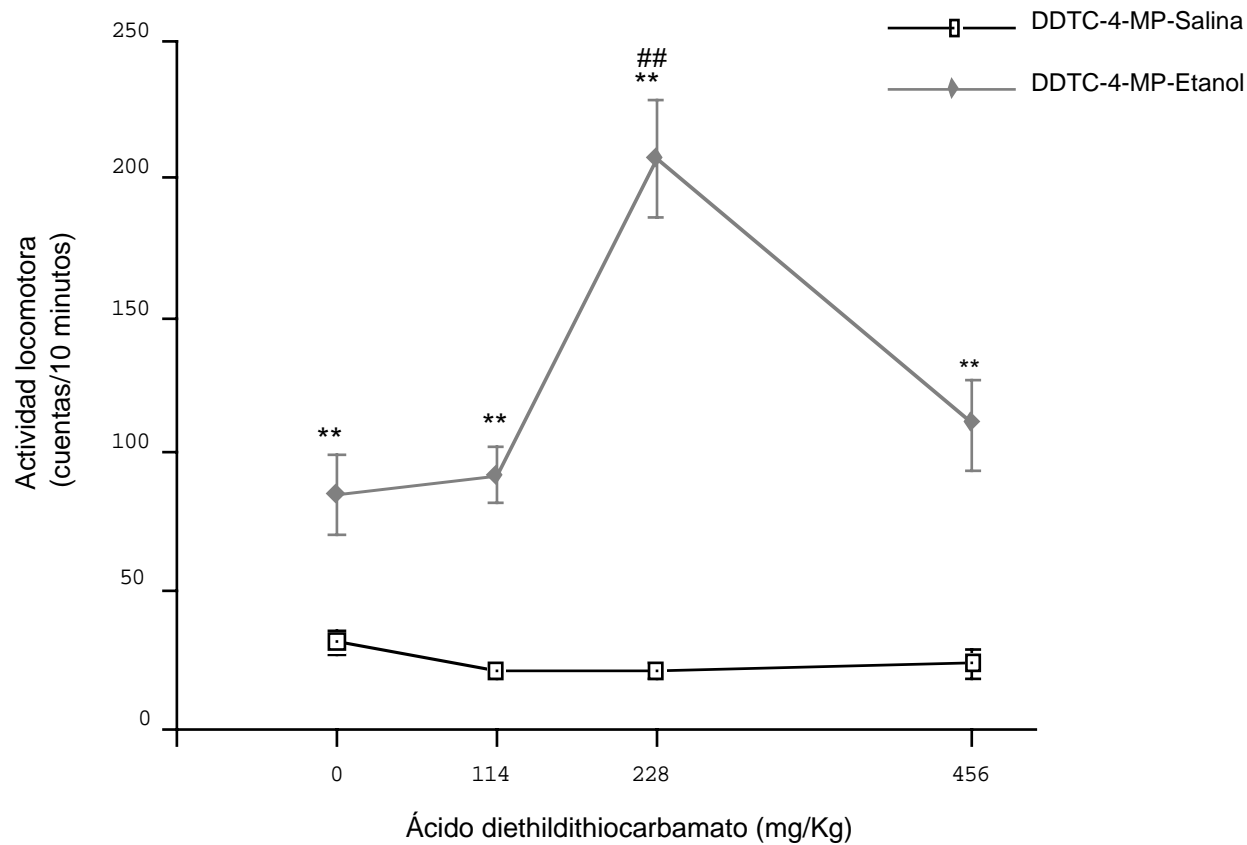
- 0 y 228 mg/kg de DDTC.
- 114 y 228 mg/kg de DDTC.
- 456 y 228 mg/kg de DDTC.

El análisis estadístico realizado, mediante la prueba LSD de Fisher, para determinar la existencia de diferencias en cuanto a la interacción de los dos grupos indicó diferencias para cada una de las dosis del inhibidor (0, 114, 228, 456 mg/kg) entre el grupo control y el experimental.

En la figura 10 también se puede observar que el 4-MP ejerce una acción significativa sobre la actividad locomotora inducida por la administración aguda de una dosis de etanol (2.4 g/kg) en animales pretratados con diferentes dosis de DDTC.

En función de los resultados obtenidos se podría afirmar que el 4-MP no ejerce por sí mismo un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad locomotora espontánea de ratones pretratados con el inhibidor DDTC, a las dosis empleadas.

Siguiendo esta línea de razonamiento, se podría afirmar también que la interacción entre el DDTC y el 4-MP en ratones tratados con etanol se traduce en un aumento estadísticamente significativo de la actividad locomotora inducida por etanol.



**Fig. 10:** Efecto de la administración conjunta de diferentes dosis del ácido dietildithiocarbamato (DDTC) y 4-MP sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg) ocho horas antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p < 0.01 para las diferencias entre los grupos DDTC-4-MP-etanol y DDTC-4-MP-salina; ##p < 0.01 para las diferencias entre los grupos salina-etanol y DDTC-etanol).



### *Discusión.*

El DDTC puede inhibir con efectividad la ALDH mitocondrial de baja Km (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991; JIN Y OTROS, 1994; HART Y FAIMAN, 1994). Esta inhibición produciría un aumento de los niveles de AcH en el organismo (YOURICK Y FAIMAN, 1989; 1991) tras la ingesta de etanol; a nivel conductual esto podría traducirse en lo que se conoce como RED. Sin embargo, esta reacción, aunque es fácilmente observable en sujetos humanos (PETERSEN, 1992) no lo es tanto en animales experimentales ya que algunos parámetros fácilmente observables como el enrojecimiento facial, mareos y otros que se engloban en la conformación de esta reacción (HARADA Y OTROS, 1981; 1985; AGARWAL Y GOEDDE, 1987) presentan en estos animales una obvia indeterminación. En función de esto, algunos autores (JENSEN Y FAIMAN, 1986) han utilizado la hipotermia y la hipotensión como índices de la RED. En el presente experimento, su evaluación se realizó mediante un test conductual de la actividad locomotora en un campo abierto.

En este sentido, la alteración de esa actividad, en cualquier sentido, ya sea aumentándola o disminuyéndola, permitiría determinar esa reacción mediada por la acción del inhibidor DDTC sobre el isozima ALDH<sub>2</sub>.

Por otra parte, también es conocida la acción del 4-MP sobre la actividad de la ADH, de forma que la administración de esta sustancia provoca un enlentecimiento del metabolismo del etanol (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985). Esta atenuación de la actividad de la ADH se traduce en una menor cantidad de AcH en el organismo (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1984, 1985) ya que el etanol está durante un periodo mayor de tiempo sin oxidar.

Los datos obtenidos en el grupo control reflejan la inocuidad sobre la actividad locomotora de las sustancias utilizadas. En este sentido, se ha obtenido que los análisis estadísticos empleados no indican diferencias en actividad para las diferentes dosis de DDTC (114, 228, 456 mg/kg) en su interacción con el 4-MP (10 mg/kg) ya que no se dan diferencias significativas respecto a la dosis 0 mg/kg de DDTC.

Esta ausencia de alteración observada en la conducta permite la utilización de estos compuestos como sustancias en sí mismas inocuas y al mismo posibilita también una interpretación de los resultados en función de su interacción con el etanol.

De esta forma, los datos obtenidos para el grupo experimental pueden ser interpretados en términos de la comentada interacción entre la acción de los inhibidores sobre el metabolismo del etanol y la acción que esta última sustancia tiene sobre la conducta motora.

Así, en este grupo, los resultados indican diferencias en todas las dosis (114, 228, 456 mg/kg) para la actividad locomotora de los animales pretratados con la combinación de las dos sustancias inhibitoras, DDTC-4-MP, que son posteriormente tratados con etanol, cuando se comparan con las correspondientes en el grupo control.

Esto indica, por una parte, la anulación de la inhibición que el inhibidor de la ALDH<sub>2</sub>, el DDTC, ejerce sobre la actividad locomotora inducida por etanol y, por otra, la potenciación del aumento que sobre la actividad locomotora tiene la administración de etanol.

En referencia a esta potenciación, una posible explicación podría ser el hecho de que a nivel periférico están anulados los efectos tóxicos producidos por la acumulación de AcH, inducida esta por la acción inhibitoria del DDTC sobre la ALDH, ya que aunque este inhibidor está ejerciendo su acción al mismo tiempo la administración de 4-MP produce un enlentecimiento sobre el metabolismo del etanol que se traduce en menores niveles de AcH circulantes en el organismo.

Sin embargo, a nivel central los acontecimientos que se producen, aunque similares en cuanto a la acción, en lo referido al efecto de esa acción son diferentes. Así, aunque el 4-MP inhibe la acción de la ADH central esto no altera significativamente la oxidación central del etanol ya que este enzima tiene una contribución muy pequeña a este metabolismo (RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972) debido a esto el etanol se metaboliza con normalidad, es decir, como si no se hubiera pretratado al animal con 4-MP. Por otra parte, la acción del DDTC, sobre el isozima cerebral ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km, se desarrolla con toda su potencia (FAIMAN Y OTROS, 1980; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982), y, como se ya se ha expuesto, esta acción se traduce en una inhibición de la acción del isozima de forma que la oxidación del AcH a acetato se produce más lentamente.

Estas acciones obtenidas a nivel central, por una parte, el metabolismo normal del etanol y, por otra, el enlentecimiento de la oxidación de AcH, generarían un aumento central de la concentración de AcH que se podría traducir en un aumento significativo de la acción que sobre la actividad locomotora tiene el etanol.

En este sentido, los datos obtenidos en el grupo experimental van en esta línea de razonamiento, ya que no solo se produce una anulación de la inhibición que el DDTC produce sobre la actividad locomotora inducida por etanol, sino también, un aumento significativamente diferente de la acción que ejerce el etanol sobre la mencionada actividad.

A continuación se presentan a modo de síntesis las conclusiones obtenidas en la fase experimental que conforman los experimentos realizados con el DDTC.

### 3.3.- Conclusiones.

1- La administración del DDTC no ejerce ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones medida en un campo abierto.

2- El DDTC ejerce *in vivo* un efecto antagonista sobre la actividad locomotora inducida por etanol que es dependiente de la dosis de inhibidor que se utiliza, de forma que a mayor dosis se obtiene también una inhibición mayor de la conducta.

3- La acción del DDTC (228 mg/kg) supone una supresión de la inducción que el etanol genera sobre la actividad locomotora de los ratones.

4- El efecto de la administración de 4-MP en animales pretratados con un inhibidor de la ALDH, como es el DDTC, y tratados posteriormente con etanol permite la expresión conductual de la curva bifásica que el etanol produce sobre la actividad locomotora.

5- El pretratamiento combinado de 4-MP y DDTC, en animales tratados con etanol, supone un aumento significativo de la actividad locomotora inducida por etanol por encima de los niveles obtenidos por el grupo control.

6- La administración conjunta de 4-MP y DDTC a diferentes dosis no supone cambios en la deambulación de los ratones en un campo abierto.

#### **4.- Fase IV: Efecto de la administración de cianamida y de la interacción de cianamida y 4-MP.**

##### **4.1.- Introducción teórica.**

##### **4.1.1.- Aspectos generales.**

La cianamida se ha denominado también cianamida cálcica citrada (CCC) o carbimida cálcica o de calcio (CC) (MERCK INDEX, 1989) ya que la cianamida es el derivado hidrolítico de la carbimida de calcio (PEACHEY Y SELLERS, 1981). Los nombres comerciales, por los que se conoce a esta sustancia son, entre otros, Temposil<sup>®</sup> y Abstem<sup>®</sup>.

Históricamente la carbimida de calcio fue introducida como una alternativa al disulfirán (FERGUSON, 1956) que también podía producir hipersensibilidad al etanol. De hecho, su utilización era preferida y más adecuada especialmente cuando el disulfirán estaba contraindicado (LUNDWALL Y BAEKELAND, 1971; LITTEN Y ALLEN, 1991; JAFFE Y OTROS, 1992) o cuando los pacientes planteaban la preferencia por un control externo apoyado con una suave reacción desalentadora (ARMSTRONG Y KERR, 1956; ARMSTRONG, 1957).

En este sentido, la reacción causada por la cianamida y el alcohol (“*mal rouge*”) es similar a la RED, pero se produce más rápidamente (OBACH Y OTROS, 1986) y tiene una duración menor (DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1978). Este síndrome, al igual que en el caso del disulfirán, es también asociado con un incremento en la concentración de AcH en sangre causada por la inhibición de la ALDH (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976a).

Por otra parte, la cianamida tiene la desventaja de reactivar el deseo (*craving*) por el alcohol debido a la suave reacción que se produce por la interacción entre CCC-etanol durante las pruebas realizadas (COLLINS Y BROWN, 1960). Sin embargo, algunos autores han informado de que la reacción al alcohol puede ser severa si se aumentan las cantidades de etanol (FERGUSON, 1956; COLLINS Y BROWN, 1960).

Así, la cianamida con incluso menos apoyo que el disulfirán, parece ser ampliamente utilizada como alternativa a este en el tratamiento del alcoholismo (MOTTIN, 1973).

#### 4.1.2.- Bioactivación.

Al igual que se ha expuesto para el disulfirán, parece ser que también la cianamida requiere una bioactivación para ejercer su acción sobre la ALDH.

De este modo, la necesidad de un proceso de bioactivación de la cianamida para que pueda ejercer su efecto inhibitorio sobre la ALDH es un aspecto de este compuesto que ha venido siendo estudiado por diferentes autores (DEMASTER Y OTROS, 1982, 1983, 1984; SHIROTA Y OTROS, 1982a, 1996 CEDERBAUM Y DICKER, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a) y los resultados obtenidos sugieren la necesidad de una bioactivación de esta sustancia para que pueda ejercer su acción.

En este sentido, se han llevado a cabo diferentes investigaciones para determinar, por una parte, qué enzima o sistema enzimático sería el responsable o el mediador de esta bioactivación y, por otra, para poner de manifiesto qué metabolito de la cianamida sería el responsable de la acción directa sobre la ALDH.

En relación con esto, aunque existen resultados que indican que la catalasa es el enzima reponsable de la activación de la cianamida en un metabolito activo y potente como inhibidor de la ALDH (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a, b; CEDERBAUM Y DICKER, 1985) otros autores plantean la posibilidad de una implicación para la N-acetiltransferasa dependiente del acetyl-S-CoA (SHIROTA Y OTROS, 1984) o para el citocromo P-450 (DEMASTER Y OTROS, 1983; SHIROTA Y OTROS, 1987b). Así, el papel de la catalasa en la bioactivación de la cianamida ha sido estudiado *in vitro* utilizando enzima hepática purificada de bovino y un sistema generador de peróxido como es la glucosa/glucosa oxidasa (DEMASTER Y OTROS, 1984; SHIROTA Y OTROS, 1996), el ascorbato (DEMASTER Y OTROS, 1985) o el hidroperóxido cumene (HPC) (DEMASTER Y OTROS, 1988). Además, en relación con la implicación de la catalasa, también se ha visto que, por ejemplo, la activación de la cianamida es abolida por el AT o la azida sódica, que son inhibidores potentes del enzima catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1984; 1985).

Por otra parte, se ha observado que la oxidación del metanol es inhibida por la cianamida y dado que en roedores el metanol es oxidado principalmente vía la actividad peroxidática de la catalasa (MANNERING Y OTROS, 1969), la inhibición por parte de la cianamida sugirió la posibilidad de que la cianamida inhibiera la actividad peroxidática de la catalasa hacia los alcoholes.

En función de los anterior, se evaluó (CEDERBAUM Y DICKER, 1985) el efecto de la cianamida sobre la oxidación del etanol y del metanol por la catalasa. Los resultados indicaron que una concentración de 0.033 - 0.05 Mm de cianamida producen un 50% de

inhibición de la oxidación del etanol o del metanol. Si la incubación de la cianamida con catalasa es previa a la adición de etanol se observa una inhibición del 70%. Sin embargo, si el etanol y la cianamida se añaden al mismo tiempo a la catalasa, o si la cianamida se añade después del etanol, no se obtiene una significativa inhibición de la actividad peroxidática de la catalasa. De esta forma la presencia de etanol protege contra la inactivación de la catalasa producida por la cianamida.

Por otra parte, y dado que la activación de la cianamida por los microsomas hepáticos ocurre también en ausencia de NADPH (DEMASTER Y OTROS, 1983), esta activación microsomal puede representar un segundo paso metabólico para la conversión de la cianamida en un inhibidor efectivo, sugiriendo que el citocromo P-450 puede estar también implicado en este proceso de activación.

En este sentido, los datos obtenidos por Shirota y otros, (1987b) indicaban que tanto la catalasa purificada como los microsomas hepáticos de rata, podían transformar a la cianamida en un inhibidor activo de la ALDH. Sin embargo, estas dos posibilidades no permitían determinar si la activación enzimática de la cianamida estaba mediada por la catalasa presente en los microsomas o si, por el contrario, implicaba a los enzimas del citocromo P-450.

Como medio de responder a esta disyuntiva, se realizó un experimento (SHIROTA Y OTROS, 1987b) en el que se inducían los enzimas del citocromo P-450 mediante el pretratamiento con fenobarbital (PB) al 0.1 %, administrado a ratas en el agua durante 6 días. Los resultados obtenidos indicaron una producción doble de cianida, un metabolito de la cianamida. Mientras que la administración del SKF-525A (4 mM), un sustrato e inhibidor del citocromo P-450, bloqueó la inducción producida por el PB. Por otra parte, la administración de AT (1 g/kg i.p.), tres horas antes del sacrificio, a ratas pretratadas con PB generó una inhibición en la actividad catalítica de sus microsomas hepáticos en un 98% y redujo, la formación de cianida, en un 20% respecto del nivel producido sin el tratamiento con AT.

Estos resultados sugieren que mientras la catalasa es mayormente responsable de la oxidación de la cianamida a cianida por microsomas no inducidos, la participación de los enzimas del P-450 hepático es importante en los microsomas inducidos por PB.

Así, parece que la cianamida por sí misma no inhibe la ALDH y debe ser enzimáticamente activada por la catalasa en un metabolito activo (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; 1984; 1985).

Los datos parecen apoyar la mediación del enzima catalasa como el sistema enzimático necesario para generar la bioactivación de la cianamida. En este sentido, se han realizado varios experimentos enfocados a determinar la implicación de este enzima, en la conversión de la cianamida en un metabolito activo o en una forma activa, mediante la medida del grado de inhibición *in vivo* (DEMASTER Y OTROS, 1983; 1984) o *in vitro* (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; 1985; SHIROTA Y OTROS, 1982a) que genera la cianamida sobre la actividad de la ALDH.

A partir de estos experimentos, se ha obtenido (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983) que mediante la incubación de ALDH de levadura con cianamida (200  $\mu$ M), en un medio que contuviera mitocondria intacta de hígado de rata, se producía una completa inhibición de la actividad de la ALDH. Sin embargo, bajo esas mismas condiciones la ausencia de la mitocondria no producía pérdida de la actividad enzimática. Se observó también que la inhibición fue dependiente del tiempo y de la concentración de la proteína mitocondrial.

Sin embargo, la adición de NADPH aumentó significativamente la activación de la cianamida catalizada por el microsomal hasta un nivel similar al producido por la mitocondria.

DeMaster y otros (1983), realizaron un examen de la distribución subcelular del sistema activador de la cianamida en hígado de rata comparando la capacidad inhibitoria relativa de la mitocondria de la cianamida y una serie de análogos y derivados. Los datos obtenidos indicaron que la cianamida activada por la mitocondria causó una inhibición del 64.5 % del enzima de la levadura comparado con el grupo control al que no se le añadió cianamida y que en presencia del citosol o los microsomas, sin añadir cofactores, produjo una inhibición del 21.2 y 37.5% respectivamente comparados con sus respectivos controles, sin embargo, la presencia de un sistema generador de NADPH consiguió que la cianamida fuera tan efectiva como con la mitocondrial.

Estos resultados demuestran que la inhibición de la ALDH por la cianamida es dependiente de su conversión a una forma activa, debido a una ausencia de inhibición *in vitro* para enzimas de ALDH purificados (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983), y que la mitocondria intacta de hígado de rata puede catalizar esta activación metabólica (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; SVANAS Y WEINER, 1985a, c).



Estos autores también han mostrado que en ausencia de un sistema generador de NADPH, la actividad microsomal es alrededor de la mitad de la existente en la mitocondria. Además en la fracción citosólica o hubo poca o ninguna actividad.

Además, la implicación de la catalasa como sistema enzimático activador de la cianamida en un metabolito activo, ha sido también estudiada mediante la acción de inhibidores de la catalasa, como el AT y la azida sódica (DEMASTER Y OTROS, 1984) o el malonato (SVANAS Y WEINER, 1985a). En este sentido, la activación de la cianamida mediada por la catalasa fue inhibida por el AT *in vivo* y por la azida sódica *in vitro*. Por su parte, el malonato disminuyó el rango de inactivación de la ALDH en mitocondria intacta por parte de la cianamida.

Los datos obtenidos (DEMASTER Y OTROS, 1984) indican que la actividad de la catalasa hepática de los animales que son pretratados con AT (1 g/kg) y cianamida (0.22 mmol/kg i.p.) se inhibe en un 90% respecto a los controles y, 4 horas después del tratamiento, permanece inhibida. Cuando solo se administró cianamida, se dio una reducción del 75% en la actividad de la catalasa hepática.

En este estudio también se ha obtenido que tanto la activación de la cianamida por la catalasa como la inhibición de la catalasa por la cianamida son bloqueadas *in vivo* por un pretratamiento con etanol (2 g/kg i.p.).

En cuanto a los resultados obtenidos con la azida sódica (DEMASTER Y OTROS, 1984), se ha visto que esta bloqueó, al igual que el AT, la inhibición que ejerce la cianamida, mediada por la catalasa, sobre la actividad de la ALDH. En este sentido, cuando se utiliza ascorbato, como fuente de peróxido, la protección de la actividad de la ALDH por parte de la azida sódica fue completa, mientras que utilizando directamente el peróxido, la azida sódica revirtió la inhibición de la ALDH atribuida a la cianamida, pero no la relacionada con el peróxido.

Así, se podría concluir que se obtienen resultados similares con el ascorbato como fuente generadora de peróxido de hidrógeno y con el peróxido solo. Aunque, con ascorbato la inhibición de la ALDH requirió tanto de catalasa como de cianamida (DEMASTER Y OTROS, 1985).

En otros estudios (DEMASTER Y OTROS, 1988) se ha utilizado como fuente generadora de peróxido al HPC y los resultados indican también que la inhibición de la actividad de la ALDH por parte de la cianamida es dependiente de la oxidación catalizada por la catalasa de la cianamida a un metabolito activo.

A partir del conjunto de los resultados obtenidos se podría afirmar que la inhibición del isozima ALDH mitocondrial de baja  $K_m$  por la cianamida, es dependiente de la conversión de esta última sustancia por un enzima para que lo transforme en un metabolito activo. Este enzima sería la catalasa, lo cual lleva a la conclusión de que la catalasa es el enzima responsable de esta bioactivación.

Además, teniendo en cuenta que la mayoría de la catalasa hepática está localizada en los peroxisomas y debido a que los peroxisomas y la mitocondria cosedimentan, el enzima que activa a la cianamida, la catalasa, sería probablemente de origen peroxisomal y mitocondrial (DEMASTER Y OTROS, 1984; SVANAS Y WEINER, 1985a, b).

#### **4.1.3.- Biotransformación y metabolitos efectivos.**

El otro aspecto relacionado con esta bioactivación de la cianamida ha sido la determinación del metabolito activo, es decir, el encargado de ejercer la acción inhibitoria directa sobre la ALDH. Ya que mientras que la catalasa ha sido identificada como el enzima responsable de la formación del inhibidor activo de la ALDH derivado de la cianamida *in vivo*, las estructuras de los metabolitos oxidados de la cianamida incluyendo los que son inhibidores activos de la ALDH han sido difíciles de encontrar (DEMASTER Y OTROS, 1984). Además, por parte de algunos autores (PRUÑONOSA Y OTROS, 1989) se ha planteado la idea de que la cianamida no necesita la conversión a un metabolito activo para ejercer la inhibición de la actividad de la ALDH.

Sin embargo, los datos obtenidos, tomados en conjunto, indican que no sería la cianamida por sí misma la que ejerce directamente el efecto, sino uno de sus metabolitos, más concretamente, el nitroxil. Así, este compuesto sería el responsable de la inhibición ejercida sobre la actividad de la ALDH mitocondrial de baja  $K_m$  (SHIROTA Y OTROS, 1987a, b, 1996; NAGASAWA Y OTROS, 1990).

Además, se planteó que la N-hidroxicianamida sería el producto intermediario de la oxidación de la cianamida, de forma que la cianamida se descompondría espontáneamente en cianida y nitroxil (SHIROTA Y OTROS, 1987b).

Como se ha comentado, se han llevado a cabo estudios (PRUÑONOSA Y OTROS, 1989) que concluyen que no es necesaria la conversión de la cianamida en un metabolito que ejerza el efecto inhibitorio sobre la ALDH. Los estudios, realizados *in vitro*, han evaluado la capacidad de la cianamida (50  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ ) en la inhibición de la ALDH mitocondrial

hepática de baja Km. Los resultados indican una inhibición irreversible de la ALDH cuando en el medio de incubación están presentes la ALDH, la catalasa, el NAD<sup>+</sup> y la cianamida. Sin embargo no se obtuvo desaparición de esta última sustancia durante un intervalo de tiempo superior a 24 horas. A partir de este dato, los autores concluyen que la cianamida no necesitaría la conversión en otra sustancia para ejercer su acción.

Desde otro planteamiento, se realizaron evaluaciones de derivados y análogos de la cianamida para determinar la habilidad de estos en ejercer un efecto inhibitorio sobre la ALDH mitocondrial. Los resultados obtenidos (DEMASTER Y OTROS, 1983) indicaban que solo los monoalquiloscianamida ejemplificados por la n-butilcianamida demostraban una inhibición significativa de este enzima.

Por el contrario, otros compuestos, isoelectrónicos en estructura con la cianamida, como el cianato potásico y el tiocianático potásico, no tuvieron ningún efecto o este fue muy pequeño (DEMASTER Y OTROS, 1983).

Otros análogos de la cianamida o derivados de esta, incluyendo al N-acetilcianamida, el mayor metabolito urinario de la cianamida (SHIROTA Y OTROS, 1982a), fueron inactivos en este sistema (DEMASTER Y OTROS, 1983).

Otro de los compuestos evaluados (SHIROTA Y OTROS, 1982b) ha sido una forma carbodiimida de la cianamida, para ello se comparó la acción inhibitoria *in vivo* de la dimetilcianamida (DMC), esta sustancia debe ser primero N-demetilada para que pueda ser considerada una forma carbodiimida, y de la cianamida sobre la ALDH *in vivo* e *in vitro*.

Los datos indicaron que la DMC administrada i.p. a ratas generó un aumento del AcH derivado del etanol (2 g/kg), medido después de la administración de este último, y disminuyó la actividad de la ALDH de baja Km mitocondrial en un 90% a las 12-24 horas. Sin embargo, la DMC (200 µM), preincubada durante cinco minutos, fue inactiva *in vitro* como inhibidor de la ALDH de baja Km en mitocondria intacta de hígado de rata. Por el contrario, bajo esas mismas condiciones la n-propilcianamida, un monoalquil de la cianamida similar a la metilcianamida, y la cianamida fueron potentes inhibidores del enzima, obteniendo inhibiciones del 83 y 99% respectivamente.

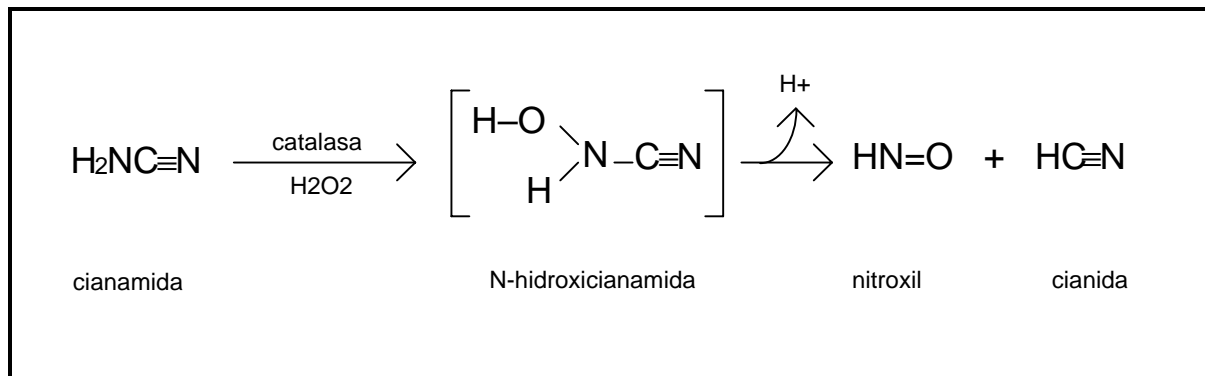
Otras de las sustancias evaluadas (NAGASAWA Y OTROS, 1986) son derivados de la cianamida que han sido acilados con otros acilos grasos, α-aminoacilos (aminoácido) o

grupos peptídicos como formas prodroga de la droga origen, la cianamida. Estos derivados, como la acetilcianamida han sido más efectivos que la cianamida (0.5 mmoles/kg i.p. o 1.0 mmoles/kg p.o.) en la elevación en sangre del AcH derivado del etanol (2 g/kg) cuando se administró a ratas, y ese efecto se prolongó por un periodo superior a 72 horas con los derivados más lipofílicos.

La cianida, es uno de los productos formados *in vitro* en la oxidación de la cianamida mediante la catalasa (SHIROTA Y OTROS, 1987a, b; DEMASTER Y OTROS, 1988). Se ha visto que cuando se elimina del medio químico a la cianamida, a la catalasa o al sistema de glucosa/glucosa oxidasa, la formación de cianida se reduce hasta niveles mínimos (SHIROTA Y OTROS, 1987a). Además, cuando la cianamida es incubada solo con *buffer*, no se obtiene cianida. También, en experimentos que han utilizado el HPC (DEMASTER Y OTROS, 1988) se ha obtenido que la cianida es un producto de la oxidación de la cianamida, de hecho la pérdida de actividad de la ALDH de la levadura indicó la formación de un inhibidor de la ALDH. En la misma línea, se obtiene que incrementos en la concentración de cianamida o de catalasa se traducen en un aumento en la formación de cianida, esto implica que esta sustancia no sería un producto de la descomposición de la cianamida. Por otra parte, estos autores (SHIROTA Y OTROS, 1987a) plantean que la cianamida solo puede ejercer sus acciones químicas o metabólicas a través del grupo ciano y/o del grupo amino y, dado que el ciano es resistente al metabolismo *in vivo*, la acción de la catalasa debe ocurrir sobre el grupo amino. Por lo tanto, se plantea que la N-hidroxicianamida debe ser el producto inicial de la oxidación de la cianamida mediada por la catalasa, apoyada por el peróxido o algún otro sistema generador de peróxido (SHIROTA Y OTROS, 1987a, 1996; DEMASTER Y OTROS, 1988). De forma que este intermediario químicamente inestable se descompone espontáneamente para producir el producto observado, la cianida nitrosilada ( $O=N-C\equiv N$ ) y un inhibidor activo de la ALDH, el nitroxil,  $[HN=O]$ , nitrosilo híbrido (NAGASAWA Y OTROS, 1990; SHIROTA Y OTROS, 1996).

Tomando como base lo anterior, se ha utilizado N-hidroxicianamida y la cianamida llamada  $^{13}C$  como marcadores isotópicos de esta posible reacción, para presentar una evidencia clara de la ecuación siguiente (NAGASAWA Y OTROS, 1990) y de la formación de nitroxil en el metabolismo oxidativo de la cianamida.

Cuadro 5. Metabolismo de la cianamida.



Además, los resultados obtenidos indican que dado que los compuestos C-nitrosos, considerados como sustitutos e los nitroxilos, inhiben la ALDH de la levadura sin necesidad de bioactivación (NAGASAWA Y OTROS, 1989) y que a determinadas concentraciones, la cianida no inhibe la ALDH (SHIROTA Y OTROS, 1987a,b). En este sentido, se podría plantear que, por una parte, la N-hidroxicianamida es el intermediario en la bioactivación oxidativa de la cianamida medida por la catalasa y, por otra, que el nitroxil producido en la oxidación de la cianamida es el inhibidor de la ALDH (NAGASAWA Y OTROS, 1990; SHIROTA Y OTROS, 1996).

En relación con esto, algunos autores (SHIROTA Y OTROS, 1996) han propuesto una vía para la biotransformación oxidativa de la cianamida que dé cuenta de todos los productos detectados, como son el nitroxil, la cianida, el nitrito y el CO<sub>2</sub>, e implique a la N-hidroxicianida y a la cianida nitrosilada como intermediarios a la par.

Actualmente la investigación se está centrando en la detección de sustancias precursoras de la cianamida (SHIROTA Y OTROS, 1997). Las sustancias evaluadas han sido, entre otras, la S-metilisotiourea y la S-n-butilisotiourea.

Los datos obtenidos en estos experimentos han puesto de manifiesto que ambas sustancias producen una inhibición de la ALDH cuando son administradas a ratas *in vivo* o *in vitro*, aumentan o los niveles de AcH en sangre, tras la ingesta de etanol, unas 119 veces respecto al grupo control que no ha sido pretratado con la sustancia. Por otra parte, se ha observado que en la oxidación de, por ejemplo, la S-n-butilisotiourea, incubada con microsomas hepáticos de rata junto con catalasa y ALDH e levadura, o cuando se añade al medio NADPH, se obtiene cianamida como metabolito.

A partir de todos estos resultados y, a modo de conclusión, se podría afirmar que la oxidación de la cianamida es catalizada por el sistema catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que da lugar a la

generación del nitroxil (HN=O), la cianida, el nitrito y el CO<sub>2</sub> como productos y, por deducción química, también amonía.

La formación de esos productos puede estar mediada por la N-hidroxicianamida y la cianida nitrosilada como intermediarios conjuntos en la oxidación de la cianamida por el sistema catalasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambas sustancias pueden generar nitroxil, que sería el inhibidor efectivo del isozima de ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km, mientras que la cianida nitrosilada puede por sí misma inhibir al enzima mediante su propensión a la nitrosilación.

#### **4.1.4.- Inhibición de la catalasa y de la ALDH por la cianamida.**

En este apartado se presentan los datos y resultados obtenidos en la literatura que muestran, por una parte, la relación entre la cianamida y la ALDH y, por otra, la relación, que es un prerequisite para que la anterior se lleve a cabo, entre la cianamida y el enzima catalasa.

Así, los datos obtenidos en los diferentes estudios realizados ponen de manifiesto que la cianamida ejerce un efecto inhibitorio sobre el isozima de ALDH<sub>2</sub> mitocondrial hepática de baja Km. Como se ha presentado anteriormente, este efecto inhibitorio está mediado por el sistema enzimático de la catalasa ya que esta posibilita la transformación de la cianamida en un compuesto activo que sería el que ejerce efectivamente la acción inhibitoria sobre el isozima de la ALDH.

Por otra parte, los resultados obtenidos también han puesto de manifiesto que la mediación de la catalasa en la biotransformación de la cianamida conlleva para el enzima una inhibición de su actividad.

##### **4.1.4.1.- Interacción entre la cianamida y la catalasa.**

La relación entre la cianamida y la catalasa se ha estudiado tanto *in vivo* (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1986; ARAGÓN Y OTROS, 1991c) como *in vitro* (CEDERBAUM Y DICKER, 1985; DEMASTER Y OTROS, 1982; 1986; 1988).

Como se dijo, los datos indican la inactivación de la catalasa durante el metabolismo de la cianamida. Así, la administración *in vivo* de cianamida (0.22 mmol/kg) dio lugar a un decremento en la actividad de la catalasa hepática del 75% tres horas después de la administración de cianamida (DEMASTER Y OTROS, 1982).

Además, se ha obtenido que el periodo temporal de incubación de la cianamida con el enzima catalasa es determinante para que se de cierto grado de interacción entre ambas, también se ha visto que las dosis de cianamida pueden aumentar su grado de inhibición en función del tiempo de incubación. En este sentido, se ha observado (CEDERBAUM Y DICKER, 1985) que si el periodo de preincubación de la cianamida con la catalasa es superior a 3 minutos, se encuentra una inhibición progresivamente mayor de la actividad peroxidática de la catalasa. De esta forma, una concentración menor de cianamida (20  $\mu$ M) puede ser efectiva para producir una inhibición de la actividad peroxidática de la catalasa, hacia el etanol y el metanol, si se permite que la cianamida se incube con la catalasa durante un periodo de tiempo conveniente.

Sin embargo, cuando el etanol se añade antes o al mismo tiempo que la cianamida, el etanol puede proteger la inhibición que ejerce la cianamida sobre la catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1985). Por otra parte, cuando la cianamida es administrada antes del etanol o sola se da una reducción del 80-85% en la actividad de la catalasa. Esto mismo se ha obtenido *in vivo*, en estudios sobre la inhibición de la ALDH, de forma que el pretratamiento con etanol en ratas tratadas posteriormente con inhibidores de la ALDH, como la cianamida, redujo los niveles de inhibición que producen estos inhibidores cuando son administrados previamente al etanol.

En este sentido, también se ha observado que en los estudios en los que se ha utilizado AT (40 mM) (DEMASTER Y OTROS, 1985; 1988) o azida sódica (DEMASTER Y OTROS, 1984), dos inhibidores del enzima catalasa, se da también una pérdida de la oxidación del etanol mediada por la catalasa. Lo mismo se ha obtenido para la cianamida (40 mM) (DEMASTER Y OTROS, 1988).

Por otra parte, se sabe que en la catalasa se dan dos tipos de reacciones, la reacción peroxidática de la catalasa apoyada por el  $H_2O_2$ , que predomina a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , mientras que a altas concentraciones predomina la reacción catalítica.

Así, formación de cantidades significativas de AcH, a partir del etanol, por la reacción peroxidática de la catalasa es altamente dependiente de una baja y prolongada concentración del oxidante  $H_2O_2$ . Al mismo tiempo la cantidad de AcH formado fue

directamente dependiente de la concentración de catalasa. Además, la inhibición de la catalasa por AT y cianamida dio como resultado una pérdida similar de la oxidación de etanol (DEMASTER Y OTROS, 1985; 1988) mientras que la cianamida administrada i.p. elevaba los niveles de AcH en ratas después del etanol, siendo la ED<sub>50</sub> para la cianamida de 0.11 mmol/kg (SHIROTA Y OTROS, 1982b).

El estudio de la sensibilidad, inhibición y recuperación, de diferentes tejidos de rata con catalasa a la inhibición de la cianamida *in vivo*, puso de manifiesto que mientras que la actividad de los tejidos en función de la actividad de la catalasa fue como sigue: hígado > riñón > eritrocitos > corazón > cerebro, el grado de sensibilidad de estos tejidos a la inhibición provocada por la cianamida, administrada i.p., fue hígado > riñón > corazón > cerebro. La actividad de los eritrocitos fue mínimamente afectada (14% con la dosis mayor de cianamida). Por otra parte, los valores de ED<sub>50</sub> medidos para la cianamida en esos tejidos fueron de 31, 44, 107 y 680 µmoles/kg de peso para cada uno de estos órganos (DEMASTER Y OTROS, 1986).

Además, la aparente similaridad entre la inhibición de la catalasa hepática por la cianamida y el AT *in vivo* sugieren que la cianamida pertenece a la familia de inhibidores de la catalasa similares al AT. Sin embargo, hay una diferencia significativa entre la cianamida y el AT, la bioactivación de la cianamida por la catalasa da como resultado la inhibición de la ALDH *in vivo* (DEMASTER Y OTROS, 1985).

En cuanto al curso temporal se ha obtenido (DEMASTER Y OTROS, 1986) que la máxima inhibición se dio una hora después de la administración i.p. de la cianamida (310 µmoles/kg) y la actividad de la catalasa volvió a los valores de los controles 24 horas después de esa administración.

Por otra parte, se ha obtenido que el AT (1 g/kg) atenúa en más de un 90% la elevación en los niveles de AcH en sangre, tras la administración de etanol a ratas, producida por la administración de cianamida (0.22 mmol/kg). Esta atenuación es dosis dependiente y se acompañó de una reducción total de la actividad de la catalasa hepática. Obteniéndose una correlación positiva entre el AcH en sangre y la actividad de la catalasa hepática (DEMASTER Y OTROS, 1984).

Los estudios realizados *in vivo* (ARAGÓN Y OTROS, 1991c), también han puesto de manifiesto que la cianamida produce una inhibición de la catalasa cerebral.



En este sentido, el tratamiento i.p. a ratas, previo a la administración de cianamida o de 4-hidroxipirazol indica que el etanol protege, en función de la dosis, a la catalasa de la acción de los inhibidores. Esto mismo se ha observado en estudios *in vitro* (ARAGÓN Y OTROS, 1991c) con homogenados cerebrales perfundidos e incubados con glucosa o glucosa oxidasa en presencia de etanol y cianamida. Los datos indican también que la cianamida ejerce una inhibición de la actividad de la catalasa que es dosis dependiente.

#### **4.1.4.2.- Reacción entre ALDH y cianamida.**

Los resultados obtenidos en los estudios realizados para determinar la naturaleza de la interacción entre ALDH y cianamida, ponen de manifiesto que la cianamida produce una inhibición del isozima de ALDH, la ALDH<sub>2</sub> mitocondrial hepática de baja Km.

En este sentido, se ha visto que la cianamida, a diferencia de otros conocidos inhibidores de la ALDH, como por ejemplo el disulfirán, inhibe *in vivo* tanto la ALDH de baja Km (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; CEDERBAUM, 1981; JÄRBE Y OTROS, 1982) como la de alta Km (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982; BRIEN Y OTROS, 1985) en las tres fracciones de este enzima, fracción mitocondrial, microsomal y citosólica. Sin embargo la primera es más susceptible a la inhibición de la cianamida ya que las dosis necesarias para la inhibición de la ALDH de alta Km son mucho mayores (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; LOOMIS Y BRIEN, 1983a, b; SVANAS Y WEINER, 1985a) aunque ambas precisan de la presencia de NAD o NADH para ser inhibidas por la cianamida (MARCHNER Y TOTTMAR, 1983). Estos resultados indican que la cianamida inhibe preferentemente el isozima ALDH mitocondrial de baja Km en el hígado de rata (LOOMIS Y BRIEN, 1983a, b), y en muestras hepáticas de rata, vaca y cerdo (WEINER, 1987; CAO Y OTROS, 1988). Sin embargo, otros autores (SANNY Y RYMAS, 1993) mediante HPLC, han obtenido resultados que indican que el tratamiento *in vivo* con cianamida produjo decrementos similares en el pico I perteneciente a la ALDH citosólica canina y en el pico II perteneciente a la ALDH mitocondrial canina, lo que indicaría que una no es más sensible que la otra a la acción de la cianamida. Además, estos mismos autores han encontrado que, *in vitro*, el pico I fue más sensible a la inactivación de la cianamida que el pico II, sugiriendo que en perros, a diferencia de otros mamíferos (LOOMIS Y BRIEN, 1983b; WEINER, 1987; CAO Y OTROS, 1988) la ALDH citosólica es más sensible a la inactivación, por parte de la cianamida, que la ALDH mitocondrial.

También se ha observado que la inhibición de la ALDH es mayor cuando se combina la catalasa, la cianamida y el peróxido, frente a la inhibición que provoca la presencia del peróxido solo (DEMASTER Y OTROS, 1985).

Así, se ha obtenido que después del tratamiento con 50  $\mu$ M de cianamida, más del 80% de la ALDH de alta Km estaba aún activa mientras que la actividad de la ALDH de baja Km era solo del 20% (SVANAS Y WEINER, 1985a). Los datos obtenidos en ratas tras la administración i.p. de cianamida (100 mg/kg) *in vivo* van en la misma línea que los anteriores ya que los resultados obtenidos indican que a esa dosis la actividad de la ALDH de baja Km está totalmente inhibida mientras que la ALDH de alta Km fue inhibida solo en un 80% (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978).

Por su parte, los estudios *in vitro* indican que la ALDH purificada solo fue inactivada a altas concentraciones de cianamida. En este sentido la evaluación de 10  $\mu$ M de cianamida, en diferentes periodos de tiempo, en la inhibición de la ALDH, generó una inactivación de la ALDH de un 70 y un 90% en incubaciones de rodajas y mitocondrias respectivamente (SVANAS Y WEINER, 1985a).

Además, se ha obtenido que la cianamida induce los niveles de la concentración de AcH en la sangre después de la administración de etanol (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976a; 1978; DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1978; 1980a; CEDERBAUM, 1981; SHIROTA Y OTROS, 1982b; STOWELL Y OTROS, 1984; CARMICHAEL Y OTROS, 1987), el pretratamiento con AT inhibe casi completamente ese aumento de AcH en sangre, sin embargo, el AT por sí mismo no tiene ningún efecto en los niveles de AcH en sangre cuando se compara con los controles (DEMASTER Y OTROS, 1985).

Por otra parte, se ha comprobado que en animales alimentados con dietas que contienen cianamida se obtiene una inhibición de la actividad de la ALDH y como consecuencia de esto se producen modificaciones en el metabolismo del AcH y en los niveles de AcH durante la oxidación del etanol (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976a, b; LINDROS Y OTROS, 1975).

En la comparación de la cianamida con otros inhibidores de la ALDH (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; 1983), como son el 1-aminociclopropanol, el disulfirán y la cianamida, se ha obtenido que las tres sustancias disminuyen la actividad de la ALDH mitocondrial de baja Km *in vivo*, pero existen diferencias entre ellos en cuanto a las dosis necesarias para

que ejerzan esta inhibición. Los estudios en los que se la ha comparado con la coprina ha arrojado resultados similares (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982).

Por otra parte, como ya se comentó, solo la administración i.p. de cianamida a ratas produjo, *in vivo*, una inhibición de la actividad de la alta Km, mientras que *in vitro*, los resultados son totalmente diferentes, de forma que la actividad de la alta km no fue afectada por la cianamida pero sí fue inhibida por el 1-aminociclopropanol y el disulfirán. Sin embargo, las tres sustancias comparten la generación de una inhibición irreversible de la actividad del enzima (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976b; DEITRICH Y OTROS, 1976).

Además, los resultados también indican que la cianamida, administrada i.p. a ratas, por sí misma no tiene ningún efecto hepatotóxico (RIKANS, 1987).

También se ha obtenido que, aunque la cianamida inhibe tanto la ALDH hepática como la cerebral (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982) existen diferencias entre la inhibición que la cianamida ejerce sobre la acción de la ALDH hepática y la cerebral (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978). En este sentido, los datos *in vivo* (DEITRICH Y OTROS, 1976) ponen de manifiesto que aunque con ninguna dosis se obtiene una inhibición completa, la inhibición de la ALDH hepática es mayor que la obtenida para la ALDH cerebral.

Así, la máxima inhibición hepática con 100 mg/kg de cianamida fue alrededor del 97%, mientras que la cerebral fue para la dosis de 200 mg/kg, produciendo una inhibición del 37%.

Datos posteriores (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978) indican una mayor inhibición con dosis menores de cianamida (5 mg/kg), y aunque se mantiene la diferencia entre el efecto de la misma dosis en hígado (85% de inhibición) y cerebro (40% de inhibición), las diferencias encontradas por estos autores entre los porcentajes hepáticos y cerebrales son menores, 60% para la ALDH hepática y 40% para la ALDH cerebral.

En cuanto al curso temporal, los datos indican que la máxima inhibición (95-98%) se dió dos horas después de la administración de cianamida (50 mg/kg), existiendo todavía cierto grado de inhibición a las 48 horas (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978).

Así, el conjunto de los datos pone de manifiesto la capacidad de la cianamida para actuar como un eficaz inhibidor tanto de la ALDH hepática como de la cerebral.

#### 4.1.5.- Reacción etanol-cianamida (REC).

Como se ha comentado en el apartado anterior, la cianamida, mediante la inhibición que produce sobre la actividad de la ALDH mitocondrial de baja Km (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976b), eleva los niveles de AcH en sangre (BRIEN Y OTROS, 1978; JÄRBE Y OTROS, 1982; DEMASTER, 1983) tras la ingesta de etanol. En relación con esto, los cambios conductuales que se producen tras la interacción entre el etanol y la cianamida han recibido el nombre de Reacción etanol-cianamida (REC), y ha sido utilizada como base para la terapia del alcoholismo.

En este sentido, en 1956, Ferguson planteó la utilización de la cianamida como alternativa al disulfirán en el tratamiento del alcoholismo ya que la reacción que se producía era más rápida (ARMSTRONG, 1957; DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1985), de menor duración (ARMSTRONG, 1957; BRIEN Y OTROS, 1978; 1985) y, además, los efectos secundarios de la cianamida eran también menores (ARMSTRONG, 1957).

Así, los efectos secundarios observados para tras el tratamiento con disulfirán como fatiga, impotencia, erupciones cutáneas, entre otros, no estaban presentes tras el tratamiento con CC. Además las dosis necesarias para cada una de las drogas también eran diferentes (MARCONI Y OTROS, 1960), ya que para el disulfirán se administraban 500 mg mientras que para la cianamida la prescripción era de 100 mg (ARMSTRONG, 1957).

En otro de los estudios, realizado para comparar las reacciones de ambas drogas al alcohol (MARCONI Y OTROS, 1960), el tratamiento consistía en la administración de disulfirán durante 20 días (0.5 g/kg), otros 20 con salina y 20 más con cianamida (50 mg/kg) o un tratamiento de 20 días con cianamida, otros 20 con salina y 20 más con disulfirán, los datos obtenidos a partir de la presión arterial y el pulso, indicarían que no existen diferencias significativas entre las dos drogas. Sin embargo, los síntomas circulatorios, la cianosis y el frío en las extremidades, entre otros síntomas, fueron menores tras el tratamiento con CC. Posteriormente, se ha informado de que algunos síntomas, como el nivel máximo de la concentración de AcH en sangre, las palpitations y la sequedad de la boca, entre otros, son más severos tras el tratamiento con CC (PEACHEY Y OTROS, 1983).

De este modo, los síntomas más frecuentes que se dan después del tratamiento con la CC son enrojecimiento corporal, palpitations, disnea, mareos, vértigo, desmayos, taquicardia, entre otros, que aunque no son severos sí son suficientes para que las

personas dejen de beber alcohol (MARCONI Y OTROS, 1960; COLLINS Y BROWN, 1960; BRIEN Y OTROS, 1978; PEACHEY Y OTROS, 1980).

En otro de los estudios iniciales (COLLINS Y BROWN, 1960) se evaluaron los efectos de la administración de la CC (100 mg) sola o combinada, una hora después, con diferentes dosis de etanol en hombres y mujeres alcohólicos. Observándose, tras la interacción, la respuesta de *flushing*, palpitaciones, náusea, vómitos y dolor de cabeza, entre otros. Mientras que la CC sola provocaba una serie de efectos como mareos o vértigos que no eran severos.

Estos signos y síntomas de la REC empiezan 15 minutos después de la interacción, logrando su máxima expresión a los 35 minutos, empezando su declive a partir de ese momento. Sin embargo, hay evidencia de que aun están presentes a los 45 minutos.

En cuanto a la eficacia terapéutica de la CC, se ha realizado algún estudio (MELLOR Y SIMS, 1971) determinado por datos que indican que en algunos sujetos no disminuye el deseo por ingerir alcohol aunque estén tomando cianamida. Para ello se tomó una muestra de hombres con adición al alcohol, que expresaron su deseo de participar con la idea de que los efectos de la interacción les hicieran desistir de ingerir alcohol posteriormente. Los sujetos ingerían cada mañana, durante tres días 100 mg de CC antes del test con etanol, y se les tomaban medidas de la presión sanguínea y del pulso antes y después de la exposición al etanol. Los resultados indicaron la presencia de *flushing* y vómitos (PEACHEY Y OTROS, 1981a, b). Además, el estudio se completó con el pase del Inventario de Personalidad (EPI) de Eysenck y Eysenck (1964), para determinar que no eran diferencias en personalidad lo que hacía decir a los sujetos que estaban o no convencidos de no seguir ingiriendo etanol a causa de los efectos de la interacción entre etanol y carbimida de calcio.

Estudios posteriores han confirmado el conjunto de efectos que se producen tras la interacción entre cianamida y etanol. En este sentido, se han obtenido resultados que muestran aumentos de AcH en sangre tras la ingesta de etanol en sujetos pretratados con CC (BRIEN Y OTROS, 1980a; PEACHEY Y OTROS, 1981a, b, c, d, e) a una dosis de CC equivalente a 50 mg para un hombre de 70 kg de peso, que es la dosis clínicamente recomendada (PEACHEY Y OTROS, 1980; 1981b, d), otros efectos han sido, palpitaciones, falta de aliento y calor facial. Estos datos se han obtenido en sujetos alcohólicos (BRIEN Y OTROS, 1978; 1980b; PEACHEY Y OTROS, 1981a, b, d, e) y en sujetos no alcohólicos (PEACHEY Y OTROS, 1980; 1983).

Por otra parte, a partir de los datos obtenidos en algunos de los estudios realizados (PEACHEY Y OTROS, 1980; 1981c) se podría trazar un esbozo de alguno de los prerequisites que deberían tener los sujetos para ser sometidos a un tratamiento con CC. Entre estos cabría destacar la ausencia de enfermedades cardiovasculares, hepáticas o renales (PEACHEY Y OTROS, 1981c). Estas conclusiones se han extraído a partir de la medida de los niveles de etanol y AcH en sangre, así como de la presión sanguínea, entre otros (PEACHEY Y OTROS, 1980). Además, habría que tener en cuenta la amplia variabilidad individual que se observa en las respuestas provocadas por la REC (BRIEN Y OTROS, 1978; 1979; PEACHEY Y OTROS, 1980; 1981b, e) debidas probablemente a la existencia de una variabilidad en la inhibición de la ALDH por la CC que puede explicar la variabilidad entre alcohólicos en los niveles de AcH en sangre durante la Reacción Acetaldehído-Cianamida (RAC) (BRIEN Y OTROS, 1978; PEACHEY Y SELLERS, 1981).

En relación con el tratamiento de la REC, al igual que se expuso para la reacción generada por la interacción entre el disulfirán y el etanol, el 4-MP también se ha utilizado como herramienta farmacológica (STOWELL Y OTROS, 1980; KUPARI Y OTROS, 1981; 1983; HILLBOM Y OTROS, 1983; JACOBSEN Y OTROS, 1988; JACOBSEN Y MACMARTIN, 1996) que moderara los efectos producidos en el organismo a partir de la interacción entre CC y etanol.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el 4-MP (5, 7 o 10 mg/kg) bloquea la acumulación de AcH inducida tras la ingesta de etanol, revirtiendo los cambios producidos por la mencionada acumulación como es la disminución de la presión arterial, la resistencia vascular o el aumento en los latidos del corazón (KUPARI Y OTROS, 1983).

Además, también se ha obtenido que tras la coadministración de cianamida (25 mg/kg) junto con 4-MP (10 mg/kg), esta dosis de cianamida inhibe en un 80% a la ALDH y genera una acumulación importante de AcH en sangre tras la ingesta de etanol (LINDROS Y STOWELL, 1982), la LD<sub>50</sub> del etanol fue de 6.5 g/kg, frente a la obtenida para cianamida sola que es de 5.9 g/kg de etanol y después del 4-MP solo, 6.7 g/kg. A partir de estos datos se ve que el 4-MP disminuye la mortalidad en ratas, provocada seguramente por el aumento de AcH mediado por la administración de cianamida, y también se observa que el 4-MP por sí mismo parece incrementar la mortalidad temprana de las ratas a la toxicidad provocada por el etanol.

Otra de las sustancias utilizadas (STOWELL Y OTROS, 1986) para el tratamiento de la REC y la RED ha sido la difenilhidramina, un antihistamínico administrado 2 horas

después de la CC (50 mg/kg) y dos horas antes del etanol (0.2 g/kg). Los resultados obtenidos indicaron un aumento rápido en la concentración de AcH en sangre tanto para el grupo placebo como para el grupo tratado con antihistamínico. Sin embargo, aunque durante los dos tratamientos se dieron los síntomas típicos de la REC, con *flushing* moderado, aumentos en las pulsaciones, y sensaciones de desagrado, los síntomas más severos de la REC, como la hipotensión y los cambios en el EEG, no se produjeron.

Como se ha visto la interacción entre cianamida y etanol genera una serie de respuestas fisiológicas, la REC (PEACHEY Y OTROS, 1981a, b) y la RAC (BRIEN Y OTROS, 1978; PEACHEY Y SELLERS, 1981) que permiten y promocionan el uso de esa sustancia como fármaco para el tratamiento del alcoholismo. Sin embargo, a continuación se presentan una serie de efectos que se podrían denominar paradójicos teniendo en cuenta la utilización de la cianamida como droga prescrita en el tratamiento del alcoholismo.

#### **4.1.6.- Efectos paradójicos.**

Como ya se ha mostrado, tras la administración conjunta de alguno de los inhibidores de la ALDH, como disulfirán o cianamida, y la ingesta de etanol, se producen incrementos en los niveles de AcH en sangre. Sin embargo algunos sujetos alcohólicos informaron de su capacidad para seguir tomando pequeñas cantidades de etanol durante varias horas y, eventualmente beber con impunidad ya que los efectos no eran aversivos y no disminuía su deseo de beber.

Para estudiar este fenómeno se realizaron una serie de estudios de doble ciego (PEACHEY Y OTROS, 1981a, b). En el primer estudio (PEACHEY Y OTROS, 1981a) los sujetos ingieren etanol (0.15 g/kg) 13.5, 14.5 y 15.5 horas después del pretratamiento con disulfirán (3.5 mg/kg), CC (0.7 mg/kg) o placebo. Los resultados indicaron que los niveles medios de etanol en sangre son los mismos para los tres episodios de bebida, tanto para disulfirán como para CC, sin embargo los niveles de AcH en sangre disminuyeron tras cada uno de los episodios de bebida en el siguiente orden tras la ingesta de cada una de las bebidas de etanol: 0.225, 0.071, 0.033 µg/ml para las bebidas 1, 2 y 3 respectivamente para la cianamida y para disulfirán, los valores fueron: 0.398, 0.285, 0.246 µg/ml respectivamente. También se obtuvo *flushing* periférico vascular que disminuyó durante las sucesivas REC y se mantuvo constante durante las RED. A partir de esto, se podría sugerir que con ingesta repetida, las REC resultantes disminuyen progresivamente en intensidad, hecho que no se observa para las RED.

En el segundo estudio (PEACHEY Y OTROS, 1981b) el protocolo de ingesta fue similar pero se variaron los intervalos temporales entre episodios de bebida (12 y 36 horas). Los resultados indicaron que tanto la CC como el disulfirán produjeron reacciones similares, en relación con cambios en la presión sanguínea, enrojecimiento facial, y un incremento en los niveles de etanol y AcH en sangre. Pero los efectos provocados bajo estas condiciones experimentales, no fueron lo suficientemente severos como para desalentar el consumo de alcohol posterior de los sujetos. Los cambios afectivos y la incidencia de palpaciones fueron mayores durante la REC.

Estos datos han sido replicados (PEACHEY Y OTROS, 1981d) sugiriendo que la inhibición de la ALDH por la CC disminuye por la ingestión repetida de etanol, ya que los efectos de una segunda dosis de etanol en sujetos pretratados con CC (0.7 mg/kg, que es la dosis equivalente a la clínicamente recomendada) produce efectos significativamente menos intensos que los obtenidos con el primer episodio de bebida.

Las implicaciones clínicas de los datos son obvias, ya que demuestran que la ingesta repetida de dosis bajas de etanol provocará una disminución de los efectos de la REC, de forma que un alcohólico será capaz de beber excesivamente con impunidad.

#### **4.1.7.- Estudios conductuales.**

Los estudios conductuales realizados con la cianamida han arrojado también datos contradictorios (AMIT Y OTROS, 1976; 1980). Por otra parte, aunque se ha evaluado la acción de la cianamida en diferentes conductas como por ejemplo, la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b) o el CAS (SPIVAK Y OTROS, 1987a), la mayoría de estudios han centrado su interés sobre la conducta de ingesta de etanol (BRIEN Y OTROS, 1979; SINCLAIR Y OTROS, 1980; AMIT Y OTROS, 1980; LAMBOEUF Y DESAINT BLANQUAT, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCLAIR Y GRIBBLE, 1985; SOCARANSKY Y OTROS, 1985; SPIVAK Y AMIT, 1987; ARAGÓN Y OTROS, 1993).

Como ya se ha presentado anteriormente, el origen del uso de la cianamida como droga utilizada en el tratamiento del alcoholismo está basado en los efectos tóxicos que provoca la acumulación de AcH en sangre, tras la ingestión de etanol, (AGARWAL Y OTROS, 1984; TUE ISRAEL, 1995) generada por la inhibición de la actividad de la ALDH mediada por la acción de la cianamida (KOE Y TENEN, 1970; DEITRICH Y OTROS, 1976; REED Y OTROS, 1976).



En este sentido y en relación con la ingesta de alcohol, se ha obtenido (SINCLAIR Y OTROS, 1980) que la cianamida (200 mg/ kg de comida) suprime la libre elección del consumo de etanol, tanto en acceso continuo como en alterno. Sin embargo, en este paradigma de libre elección se han obtenido resultados opuestos (AMIT Y OTROS, 1976; 1980) a los anteriores ya que 25 mg/kg de cianamida i.p. no tuvieron influencia sobre el consumo de etanol. Aunque sí se dio una supresión de la ingesta de etanol en ratas tratadas diariamente con Temposil® (25 mg/kg) que tenían un acceso continuo a agua y a etanol (AMIT Y OTROS, 1980).

Por otra parte, la utilización de un paradigma de acceso restringido frente a uno de acceso libre también se ha utilizado en la evaluación de los efectos de la cianamida sobre la ingesta de etanol, de sacarina-quinina y de agua. Los resultados indicaron que en los animales de sacarina-quinina no modificó la preferencia, pero el consumo de etanol fue suprimido con un decremento concomitante en la preferencia por el etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1993). Estos resultados indican que la cianamida puede tener un efecto específico sobre la ingesta de etanol cuando los animales tienen una disponibilidad de etanol continua.

El tratamiento crónico con etanol en ratas y la posterior interacción con cianamida también indicó una supresión en la ingesta de alcohol por la cianamida. Así, el tratamiento de libre elección a ratas, durante 9 semanas, entre etanol y agua y el tratamiento durante una semana con cianamida (25 mg/kg i.p.), puso de manifiesto una disminución de la ingesta espontánea de etanol, alrededor de un 35%, al mismo tiempo que causaba alteraciones metabólicas como la inhibición de la ALDH y de la catalasa (LAMBOEUF Y DE SAINT BLANQUAT, 1980).

En otro experimento, en el que se evaluó si la presencia de alcohol y la ruta de administración de cianamida afectaba a la ingesta de etanol, utilizando dosis similares de cianamida (SINCLAIR Y GRIBBLE, 1985), se obtuvo una supresión de la ingesta de etanol en ratas sometidas a un tratamiento subcrónico en el que se administraban inyecciones subcutáneas (s.c.) de cianamida (10 mg/kg) 3 veces al día durante 4 días, durante el tratamiento a ratas que tenían libre elección entre etanol y agua sin estar deprivadas de etanol y, sin embargo, provocó un incremento significativo en la selección posterior de etanol en ratas tratadas con la cianamida durante la deprivación de etanol.

Puede observarse que la presencia de etanol fue importante para determinar los efectos de la cianamida. Así, si el alcohol estaba presente al mismo tiempo que la cianamida disminuía el consumo de alcohol temporalmente reducido mientras la cianamida

fue administrada. Sin embargo, si cuando la cianamida era inyectada, solo estaban presentes la comida y el agua, se daba un incremento en el consumo posterior de alcohol. Además, la ruta de administración de la cianamida puede ser también importante ya que el incremento significativo solo fue encontrado con inyecciones de cianamida ya que los resultados obtenidos en los experimentos en los que la cianamida está presente en la comida de los animales son inconcluyentes.

Por otra parte, la importancia de la ruta de administración de la cianamida ya había sido puesta de manifiesto indicando su influencia en el incremento del consumo de alcohol (CRITCHER Y OTROS, 1983a, b; CRITCHER Y MYERS, 1987).

En este sentido, la administración s.c. de cianamida (10 o 15 mg/kg) dos veces al día durante tres días provoca un aumento en la ingesta de etanol, que se mantuvo incluso 6 semanas después del tratamiento con cianamida (CRITCHER Y MYERS, 1987).

El conjunto de los resultados obtenidos pone de manifiesto que los datos referidos a la acción de la cianamida en la ingesta de etanol son contradictorios, aunque quizá podrían ser explicados por las diferencias entre los protocolos experimentales utilizados. Sin embargo, los problemas con la cianamida siguen existiendo ya que otro conjunto de resultados (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) indican que no sería el exceso de AcH periférico el responsable de la supresión de la ingesta de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981), las modificaciones en la actividad locomotora tras el tratamiento con etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987b) o el CAS inducido por etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987a).

Estos autores sugieren que la supresión de la ingesta por parte de la cianamida no dependería de la acumulación periférica de AcH, ya que esta supresión se daba también cuando la acumulación periférica de AcH era prevenida con un inhibidor de la ADH, el 4-MP (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCLAIR Y OTROS, 1980) lo que sugiere que la cianamida afecta a las conductas inducidas por etanol por alguna acción relacionada con la inhibición directa de la ALDH cerebral, por parte de la cianamida. Esta sugerencia es apoyada por las investigaciones sobre el consumo voluntario de alcohol en ratas (AMIR, 1978a; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SOCARANSKY Y OTROS, 1984).

En relación con esto, se ha obtenido que la administración de dosis bajas de 4-MP producen una inhibición parcial del metabolismo del etanol lo que podría permitir que casi todo el AcH producido por el etanol fuera metabolizado dentro del hígado, eliminando así la acumulación de AcH en sangre (LINDROS, 1975).

Otras explicaciones para un posible mecanismo de las acciones de la cianamida puede venir de los resultados obtenidos que indican que la cianamida reduce la liberación de NE en el cerebro (LINDROS Y OTROS, 1981b).

Además, si el enzima catalasa, al ejercer de mediador en la bioactivación de la cianamida, es también inhibido por la cianamida, esto se podría traducir en que no se obtenga AcH central en la misma proporción que sin esa inhibición lo cual supondría que no existiría una concentración suficiente de AcH para producir los efectos psicofarmacológicos de forma que los animales no beberían alcohol.

También, en relación con la conducta de ingesta, se han utilizado diferentes cepas de ratas (SINCLAIR Y LINDROS, 1981) estas fueron alimentadas con una dieta que contenía cianamida (200 g/kg de comida) y los resultados nuevamente muestran que esta sustancia supone una supresión de la ingesta voluntaria de etanol en ratas incluso aunque la acumulación tóxica de AcH sea prevenida por la administración de 4-MP, que era añadido a los fluidos, alcohol y agua, lo que suponía una ingesta diaria de 7-9 mg/kg en ratas Long Evans y de 8-11 mg/kg en ratas AA y ANA.

El 4-MP fue administrado durante 10 días y se compararon los resultados de los diez días anteriores al tratamiento con 4-MP, los del tratamiento y los 10 posteriores sin tratamiento. Obteniendo que la ingesta de alcohol no era afectada significativamente por el tratamiento con 4-MP.

Se ha demostrado que incluso una baja concentración de 4-MP (0.4 mM) en una dieta líquida que contenga etanol reduce significativamente los niveles de AcH como consecuencia de la ingesta de esa dieta (LINDROS Y OTROS, 1979).

En otro experimento (SINCLAIR Y LINDROS, 1981) se utilizaron ratas de la cepa ANA que tienen un bajo consumo de etanol y que desarrollan niveles elevados de AcH tras el consumo de etanol (ERIKSSON, 1973). Se pretrató a estas ratas con cianamida para suprimir su ingesta de etanol. Sin embargo, los bajos niveles de AcH obtenidos con la administración de 4-MP no suponen un aumento en la ingesta de alcohol.

Estos resultados podrían indicar que la acumulación de AcH probablemente no es el factor limitante de la ingesta de alcohol y no sería el responsable de la supresión de la ingesta de alcohol por la cianamida.

Además, aunque la actividad de la ALDH fue prácticamente la misma para el grupo de cianamida y para el grupo de cianamida y 4-MP, ambos tuvieron significativamente actividades menores que el grupo control.

El pretratamiento con cianamida en la dieta a ratas de la cepa ANA con anterioridad al acceso continuado a etanol y agua. Las tres semanas posteriores fueron de exposición a un acceso forzoso a etanol o a etanol y 4-MP. Los resultados obtenidos indicaron que en ninguna de las condiciones experimentales el 4-MP aumentó el consumo de alcohol, ni en consumo forzoso ni en consumo voluntario.

En otro experimento, ratas AA, fueron divididas en grupos en función de su ingesta de etanol, uno de estos grupos fue sometido a un tratamiento con 4-MP. Tras esto se les aplicó un procedimiento de acumulación de AcH, para ello cada animal del grupo control o del grupo tratado con cianamida, era intubado con 1.5 g/kg de etanol, mientras que los del grupo de cy y 4-MP, fueron tratados con etanol al 10% (v/v) y 1mM de 4-MP.

Las muestras de sangre e hígado fueron recogidas 1,5 horas después. Los resultados obtenidos indican que la cianamida suprime rápidamente la ingesta y que la adición de 4-MP no elimina la supresión ya que el consumo de etanol para el grupo tratado con cianamida y 4-MP fue prácticamente el mismo que el obtenido para el grupo que solo fue tratado con cianamida. Sin embargo, el 4-MP previno completamente la acumulación de AcH durante el metabolismo del etanol. Además, las actividades de ALDH para el grupo de solo cianamida y para el grupo de cianamida y 4-MP fueron prácticamente las mismas, y ambas fueron también menores que la actividad de la ALDH del grupo control.

En otro experimento, se prolongó el tratamiento combinado de cianamida y 4-MP durante 2 semanas. Sin embargo, el aumento en el periodo de tratamiento con 4-MP no modificó la supresión en la ingesta de etanol inducida por la cianamida.

Además, se ha comprobado que la cianamida no genera una inflexibilidad en la conducta de beber ya que la retirada del tratamiento genera una recuperación en los niveles de ingesta de etanol tres días después de retirar el tratamiento con cianamida.

También se ha comprobado, en ratas de las cepas AA y Long Evans, que la administración concurrente de cianamida y 4-MP suprime la ingesta pero en menor

proporción que en el grupo tratado solo con cianamida, sin embargo, las diferencias entre ambos no fueron significativas.

Del mismo modo, los datos sobre la actividad de la ALDH cerebral indicaron una mayor reducción para el grupo tratado solo con cianamida mediante la utilización de un grupo control que no estuvo en contacto con etanol. Para ello, estos animales fueron pretratados con cianamida y 4-MP para determinar que el efecto del 4-MP en la acción de la cianamida sobre la ALDH no era dependiente de la presencia de etanol o del AcH derivado de este.

Los resultados indicaron para los tres grupos una alta correlación positiva entre ingesta de etanol y actividad de la ALDH ( $r=0.825$ ). La mayor fue para el grupo de cianamida y 4-MP ( $r=0.845$ ), y la menor para el grupo de solo cianamida ( $r=0.266$ ), el grupo control obtuvo una correlación de 0.356.

En este conjunto de experimentos puede verse que los niveles elevados de AcH en sangre no son el factor limitante de la ingesta de etanol ya que el 4-MP claramente previene la acumulación de AcH durante el metabolismo del etanol (LINDROS, 1975; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987). Así, la inhibición producida por la cianamida aumenta los niveles de AcH y disminuye la ingesta de etanol, con la administración de 4-MP disminuyen los niveles de AcH pero no se da un aumento en la ingesta. Por lo tanto, la inhibición de la ingesta de etanol por cianamida no se debe a la acumulación de AcH periférico.

Sin embargo, se ha obtenido que el 4-MP por sí mismo puede suprimir la ingesta de etanol (30 mg/kg i.p.) en días alternos. Administrado una hora antes del etanol disminuye el consumo posterior de etanol (CARR Y OTROS, 1980). Aunque se plantea que la explicación más probable para esos resultados es que el 4-MP reduzca la capacidad metabólica para eliminar etanol tanto que para los animales fue imposible mantener los altos niveles de ingesta de etanol.

Así, aunque la acumulación de AcH no es necesaria para la supresión inducida por la cianamida, los niveles de supresión para el tratamiento combinado de cianamida y 4-MP fueron algo menores que los de la cianamida sola lo que podría sugerir que el AcH podría intensificar la supresión.

En definitiva, la supresión de la ingesta de etanol por la cianamida parece ser un resultado de su acción inhibitoria directa sobre la actividad de la ALDH cerebral. Esta idea

es apoyada por los resultados que indican que el consumo de alcohol tiene una correlación mayor con la actividad de la ALDH en el cerebro que con la actividad de la ALDH hepática (AMIR, 1977; 1978a, b).

En este sentido, trabajos posteriores (SOCARANSKY Y OTROS, 1984; 1985) han estudiado el papel de la ALDH cerebral en la ingesta voluntaria de etanol en ratas.

Así, se realizó un estudio (SOCARANSKY Y OTROS, 1984) para determinar la relación entre consumo voluntario de etanol y actividad de la ALDH en tres cepas de ratas. Los resultados indicaron que ni la cantidad de alcohol consumido por cada una de ellas ni los niveles de actividad de la ALDH de los animales tratados con etanol diferían entre sí. Por otra parte, los niveles de consumo de alcohol correlacionaron mejor con la actividad de la ALDH cerebral que con la capacidad de la ALDH hepática para metabolizar aldehído. Además, a diferencia de la ALDH cerebral, los niveles en el hígado fueron significativamente mayores para los animales que consumen etanol frente a los controles.

También, se demuestra, además, que las diferencias en ALDH cerebral no son producidas por la ingesta de alcohol, sino que son características genéticas previas que podrían determinar la ingesta de etanol. Así, los resultados de este experimento confirman los obtenidos anteriormente por otros autores sugiriendo una relación directa entre la actividad de la ALDH cerebral y el consumo de etanol (AMIR, 1977; 1978; AMIR Y STERN, 1978; SINCLAIR Y LINDROS, 1979).

En relación con lo anterior, los datos obtenidos a partir de los análisis bioquímicos (SOCARANSKY Y OTROS, 1985; SPIVAK Y AMIT, 1987) sobre las diferentes formas subcelulares de la ALDH cerebral, mitocondrial, microsomal y citosólica, obtenidos con ratas Long Evans también ponen de manifiesto la presencia de altas correlaciones entre las fracciones de ALDH mitocondrial de baja Km, la microsomal y la ingesta de etanol.

Posteriormente, también en relación con la ingesta de etanol, otros autores (SPIVAK Y AMIT, 1987) han investigado el posible papel del AcH y los enzimas que lo metabolizan utilizando varias manipulaciones enzimáticas. Las manipulaciones implicaban a la cianamida (25 mg/kg) y al 4-MP (10 mg/kg) y el interés estaba centrado en determinar el papel del AcH periférico y central sobre la mencionada ingesta mediante episodios de bebida (*bouts*).

Los resultados indican que los animales pretratados con cianamida (grupos: salina+cianamida y 4-MP+cianamida) consumieron más cantidad de alcohol. Lo que

indicaría la implicación de la ALDH ya que el AcH, en el grupo tratado con 4-MP, estaría disminuido y, sin embargo, también se observan aumentos en la ingesta. Estos resultados además, sugieren que la ALDH cerebral puede tener un papel en la regulación del consumo de etanol, por ejemplo, regulando los niveles centrales de AcH (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987).

Además, se determinó la importancia farmacológica del *bout* mediante la evaluación de la actividad locomotora en ratas (SPIVAK Y AMIT, 1987). Los resultados indicaron una disminución de la misma en el grupo obteniendo que esta fue disminuida en el grupo tratado solo con cianamida, aunque los niveles de ingesta fueron comparables a los de los demás grupos.

Esto indicaría que la cianamida provoca una acumulación periférica de AcH que se traduce en una disminución de la actividad locomotora, que no se debe a los efectos de la cianamida *per se* ya que en el grupo tratado con cianamida y 4-MP también se hubiera observado alguna alteración de esta actividad.

Estos datos apoyan los obtenidos por Gill y otros (1986) afirmando que el *bout* tiene significación farmacológica. Además, los datos indican un papel para los enzimas que metabolizan etanol a nivel central en la regulación de la ingesta de etanol mediante la regulación de los niveles de AcH en el cerebro.

También se ha planteado la mediación de la ALDH cerebral en otras conductas inducidas por el alcohol como son la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b) y el CAS (SPIVAK Y OTROS, 1987a). Para determinar esta mediación se han valido de manipulaciones enzimáticas mediante la cianamida, que inhibe la ALDH, y el 4-MP, que inhibe a la ADH y disminuye los niveles periféricos de AcH tras la ingesta de etanol en animales pretratados con cianamida.

Los datos obtenidos en el primer estudio (SPIVAK Y OTROS, 1987b) indican que la actividad locomotora de ratas pretratadas con cianamida (salina-cianamida o cianamida-4-MP) está disminuída, sobre todo para las dosis menores de etanol (0.4, 0.8 g/kg). De nuevo los resultados no pueden deberse a la acumulación de AcH por la acción de la cianamida ya que en el grupo pretratado con 4-MP está eliminada. Lo que es común a estos dos grupos es la inhibición de la ALDH por parte de la cianamida. Además, los análisis bioquímicos indican que solo existe acumulación de AcH en los animales del grupo salina-cianamida (25 mg/kg). Sin embargo, los resultados obtenidos son inconsistentes con los del experimento anterior (SPIVAK Y AMIT, 1987) en el que los

animales pretratados con cianamida sola demostraron depresión locomotora tras ingesta de etanol mediante el procedimiento del *bout*. Las discrepancias entre este estudio y el de ingesta podrían deberse a la diferencia en el procedimiento experimental.

Como se ha expuesto, la mediación de la ALDH también se ha evaluado para el CAS inducido por etanol en ratas mediante una manipulación enzimática similar a la del experimento anterior (SPIVAK Y OTROS, 1987a), se obtiene que en los grupos tratados con cianamida se da una reducción de la ingesta de sacarina tras el condicionamiento. Y, al igual que en el caso anterior, este resultado no puede ser explicado por la acumulación de AcH periférico. Siendo lo común a ambos grupos la inhibición de la actividad de la ALDH cerebral por la acción de la cianamida.

En este trabajo se ha obtenido también una potenciación mediada por la cianamida del CAS inducido por etanol –grupos salina-cianamida y cianamida-4-MP) a la dosis más baja (0.4 g/kg) y una atenuación del CAS a la dosis más alta (1.2 g/kg).

Así, los resultados indican que el AcH y la ALDH cerebral pueden contribuir a las propiedades del CAS inducido por etanol. Además, la alteración en la ALDH cerebral por la cianamida puede haber potenciado las propiedades farmacológicas de una dosis subumbral de etanol. Esta sugerencia se apoya en los datos obtenidos con humanos pretratados con cianamida o disulfirán y tratados con bajas dosis de etanol que informan de aumento en el humor y en la euforia comparados con los sujetos controles que no informaron de esos efectos tras las mismas dosis de etanol (BROWN Y OTROS, 1983).

A modo de resumen, como se ha visto a lo largo de la exposición, la manipulación enzimática del metabolismo del etanol mediante la alteración de los enzimas implicados en su oxidación, podría permitir afirmar no solo la existencia de un metabolismo central del etanol sino también, y más importante si cabe, determinar si es el AcH el responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Así, el planteamiento de que las diferentes acciones del etanol se ven mediadas por los sistemas enzimáticos implicados en su metabolismo, lleva a la realización de los experimentos que componen la última parte de esta Tesis Doctoral. Para ello otra de las sustancias empleadas en este estudio ha sido la cianamida, que como se ha expuesto es un inhibidor de la ALDH mitocondrial hepática de baja  $K_m$  (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982; LOOMIS Y BRIEN, 1983a; BRIEN Y OTROS, 1985). Este compuesto ha sido analizado teniendo en cuenta su doble efecto inhibitorio ya que, por una parte, inhibe al isoenzima de ALDH,



la ALDH<sub>2</sub> (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976; 1978; 1983; BRIEN Y OTROS, 1985) y, por otra, inhibe al enzima catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1986; ARAGÓN Y OTROS, 1991c).

De este modo, se concluye la fase experimental que compone esta Tesis Doctoral, mediante el uso de una sustancia que combina la inhibición de ambos enzimas. En este sentido, en un primer momento se utilizó el AT como inhibidor irreversible del enzima catalasa, en segundo lugar, el DDTC fue la sustancia que actuó como inhibidor de la ALDH<sub>2</sub> y, en último lugar, se emplea la cianamida como compuesto que inhibe a tanto a la catalasa como a la ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km. De esta forma se abarca toda la curva metabólica del etanol (ver los esquemas recogidos en el apéndice).

Estos experimentos y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

## **4.2.- Experimentos.**

### **4.2.1.- Experimento nº 11.**

**El efecto de diferentes dosis de cianamida sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por etanol en ratones.**

#### *Objetivos.*

Con este experimento se pretendían cubrir dos objetivos. Por una parte, el efecto que diferentes dosis de cianamida pudieran tener sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones en un campo abierto y, por otra, se determinó el efecto que este mismo abanico de dosis tendría sobre la actividad locomotora inducida por la administración de una dosis aguda (2.4 g/kg) de etanol en ratones, siendo esta medida en un campo abierto.

Por ello, en este primer experimento se recoge el estudio de la respuesta de dosis de la cianamida sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por ratones en un campo abierto.

### *Hipótesis.*

Las hipótesis para este experimento fueron las siguientes:

1- La cianamida, a las dosis empleadas, no ejercerá por sí misma ningún efecto sobre la actividad locomotora de los animales tratados con solución salina.

2- La administración de cianamida producirá una inhibición de la actividad locomotora inducida por etanol que será dependiente de la dosis de cianamida utilizada.

### *Procedimiento experimental.*

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizaron 64 ratones macho con las características descritas anteriormente en el apartado de materiales y método.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos, experimental o control, que integran el experimento. Se establecieron cuatro niveles en cada uno de los grupos de forma que cada uno de ellos contaba con 8 animales por nivel.

El pretratamiento de los animales consistió en la administración aguda, vía i.p., de las dosis de cianamida analizadas dependiendo de que pertenecieran a uno u otro nivel.

Las dosis utilizadas de cianamida fueron las siguientes:

- 0 mg/kg.
- 12.5 mg/kg.
- 25 mg/kg.
- 50 mg/kg.

El volumen de inyección para la dosis 0 mg/kg de cianamida se obtuvo calculando una cantidad de salina equivalente a la dosis 25 mg/kg de cianamida.

En cuanto a las dosis utilizadas, el rango empleado se calculó a partir de la dosis de 25 mg/kg. Como se presentó anteriormente, esta dosis ha sido ampliamente utilizada

(AMIT Y OTROS 1976; DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; HILLBOM Y OTROS, 1983; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) en diferentes estudios en los que se ha estudiado la ingesta de etanol, la actividad locomotora o el CAS inducidos por etanol, entre otros.

Las dosis de 12.5 y 50 mg/kg son el resultado de una progresión geométrica realizada a partir de la dosis de 25 mg/kg.

El protocolo temporal que se siguió en este primer experimento fue el siguiente. Tras una primera inyección de cianamida y transcurrida hora y media, los animales pertenecientes a los dos grupos, experimental y control, fueron inyectados con una solución salina. Media hora después de este tratamiento, los animales eran inyectados nuevamente, con solución salina los pertenecientes al grupo control y con una dosis de etanol (2.4 g/kg) los que formaban parte del grupo experimental.

Este protocolo temporal se estableció a partir de los estudios sobre inhibición de la ALDH por parte de la cianamida, en estos se ha obtenido que el curso temporal de la inhibición de la actividad de la ALDH indica una inhibición máxima a las dos horas de la administración de la cianamida (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; BRIEN Y OTROS, 1985). En función de esto se realizaron estudios preliminares para determinar la secuencia de administración de las sustancias restantes; a partir de los resultados obtenidos, se administró la solución salina 1.5 horas después de la cianamida y el etanol dos horas después de la primera inyección.

La inyección correspondiente a la administración de salina se realiza como un control para experimentos posteriores, en los que se utilizan inhibidores de la ADH como herramienta farmacológica, como medio de evitar que ese protocolo en la administración de las sustancias fuera una variable contaminante en la interpretación de los resultados.

Tras la administración de etanol los animales fueron situados inmediatamente en el aparato de campo abierto para su evaluación conductual.

### *Resultados.*

En la figura 11 podemos observar los dos efectos evaluados. Por una parte, el efecto que las diferentes dosis de cianamida tienen sobre la actividad locomotora espontánea de

## Fase II: Efecto de la administración de cianamida y de la interacción de cianamida y 4-MP

los ratones y, por otra, la acción de este inhibidor sobre la actividad locomotora inducida por una inyección aguda de etanol (2.4 g/kg).

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante una prueba de ANOVA de los grupos implicados en el experimento.

Así, los aspectos analizados fueron el factor GRUPO y el factor DOSIS como factores entre sujetos. El factor grupo constaba de dos niveles, por una parte, los animales tratados con etanol y, por otra, los animales tratados con solución salina. Mientras que el factor dosis presentaba cuatro niveles, uno por cada una de las dosis de cianamida utilizadas (0, 12.5, 25, 50 mg/kg).

Este análisis indicó diferencias estadísticamente significativas para la INTERACCIÓN (grupo x dosis), y para uno de los factores, el efecto DOSIS.

Los valores de F obtenidos fueron los siguientes:

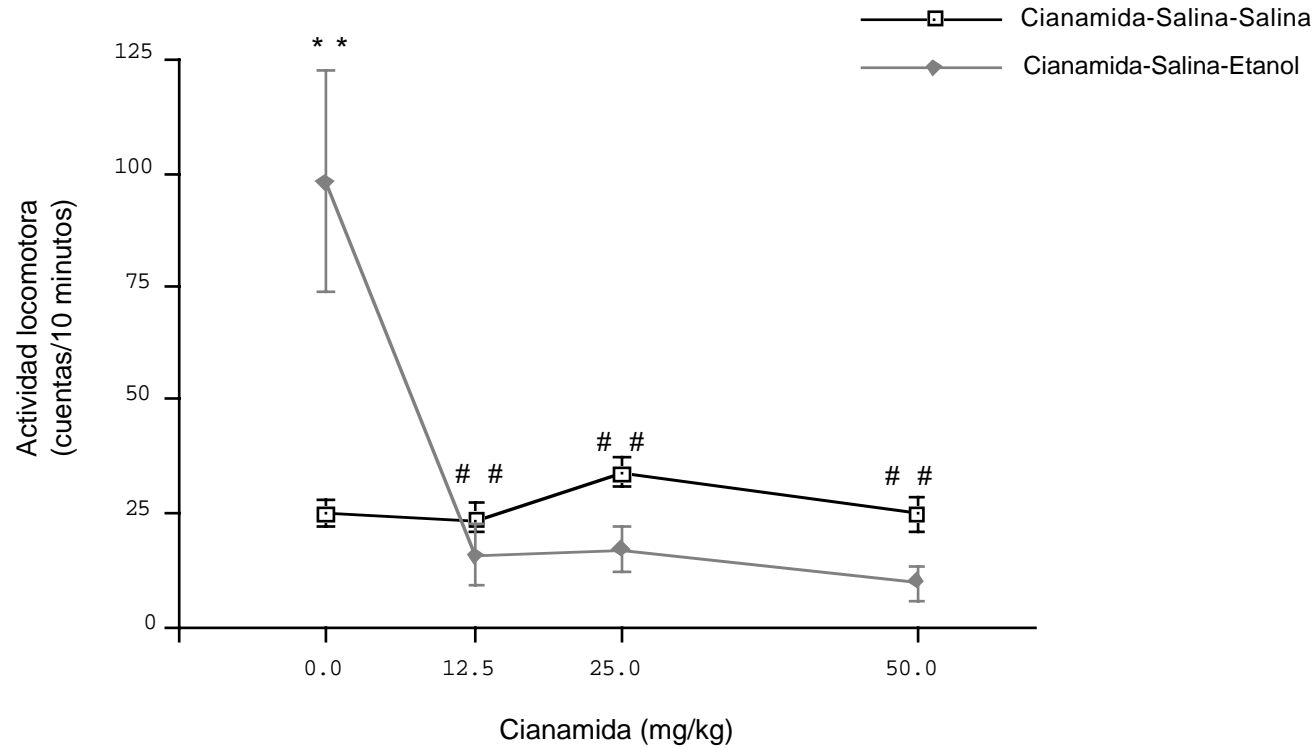
Dosis	F (3,56)= 9.610	p < 0.000
Grupo	F (1,56)= 1.713	p < 0.196
Interacción	F (3,56)= 10.604	p < 0.000

En la figura 11 se puede observar que en los animales pertenecientes al grupo tratado con solución salina no se obtuvieron diferencias significativas, esto indica que la cianamida administrada a ratones no tiene por sí misma un efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones a ninguna de las dosis utilizadas.

Posteriormente se analizó la interacción entre los dos factores mediante la prueba estadística LSD de Fisher. Los resultados indicaron diferencias para la dosis 0 mg/kg de cianamida.

Los datos obtenidos respecto a las posibles diferencias estadísticas entre las dosis del inhibidor en su interacción con el etanol se realizó una prueba *post hoc* LSD de Fisher, encontrando diferencias entre la dosis 0 mg/kg de cianamida y las dosis restantes de esta misma sustancia (12.5, 25 y 50 mg/kg).

Los resultados recogidos en la figura 11, también parecen indicar que el efecto que ejerce la cianamida sobre la actividad locomotora inducida por el etanol es dependiente de la dosis de inhibidor administrada, aumentando la inhibición de la conducta a medida que aumenta la dosis de inhibidor.



**Fig. 11:** Efecto de diferentes dosis de cianamida sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con cianamida (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) dos horas antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg).

Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\* $p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos cianamida-salina y cianamida-etanol; ## $p < 0.01$  para las diferencia entre el grupo salina-etanol y el grupo cianamida-etanol).

*Discusión.*

En este experimento se ha estudiado el efecto que pudieran desarrollar diferentes dosis de cianamida (0, 12.5, 25 y 50 mg/kg) sobre la actividad locomotora espontánea, al mismo tiempo se ha evaluado el efecto de estas dosis sobre la actividad locomotora de ratones inducida por etanol en un campo abierto.

Como se ha visto los resultados indican que la cianamida a ninguna de las dosis utilizadas afecta la actividad locomotora espontánea de los ratones. Ya que los análisis *post hoc* no mostraron diferencias en la actividad locomotora de los ratones a ninguna de las dosis utilizadas de cianamida y los animales pretratados con salina y tratados con una dosis 0 mg/kg de cianamida. Estos resultados son congruentes los estudios que han mostrado que la cianamida i.p. no es hepatotóxica por sí misma (RIKANS, 1987).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el grupo experimental ponen de manifiesto que la cianamida también ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por etanol en un campo abierto. En este sentido, puede observarse en la figura 11 que la cianamida, en todas las dosis utilizadas (12.5, 25 y 50 mg/kg), provoca una depresión de la actividad motora inducida por etanol en un campo abierto.

Las pruebas *a posteriori* mostraron diferencias entre la actividad de los animales pretratados con la dosis 0 mg/kg de cianamida y 2.4 g/kg de etanol, y los animales pretratados con cualquiera de las dosis utilizadas de cianamida que son posteriormente tratados con etanol.

Estos resultados son coherentes con los obtenidos anteriormente por otros autores (SPIVAK Y OTROS, 1987b) referidos a la alteración de la actividad locomotora inducida por etanol en ratas pretratadas con cianamida. Esta alteración locomotora, al igual que ocurre con otras conductas inducidas por etanol, puede ser atribuida al aumento en la concentración de AcH periférico (LINDROS Y STOWELL, 1982; HILLBOM Y OTROS, 1983), tras la administración de etanol, mediado por la acción que la cianamida ejerce sobre la actividad de la ALDH, provocando la inhibición de la actividad de este enzima (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; LAMBOEUF Y DE SAINT BLANQUAT, 1980; NAGASAWA Y OTROS, 1986). Sin embargo, otros autores (SINCLAIR Y LINDROS, 1981, 1984; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) han planteado un punto de vista alternativo al de que la toxicidad provocada por el aumento en los niveles de AcH en sangre sean los

responsables de la alteración de las conductas inducidas por etanol. En este sentido, se ha propuesto que tanto la catalasa como la ALDH cerebrales son los sistemas enzimáticos que median en las alteraciones observadas.

A partir de los resultados obtenidos se podría afirmar que la cianamida a las dosis utilizadas en este experimento ejerce un efecto antagonista sobre la actividad locomotora medida en un campo abierto inducida por etanol en ratones.

#### **4.2.2.- Experimento n° 12.**

**Efecto de la administración aguda de cianamida sobre la actividad locomotora inducida por distintas dosis de etanol en ratones.**

##### *Objetivos.*

El presente experimento tiene dos objetivos. Uno estaría orientado a determinar la respuesta de dosis del etanol en un campo abierto y el otro se orientaría a determinar el efecto de la administración aguda de una dosis de cianamida (25 mg/kg) sobre la actividad locomotora inducida por un amplio rango de dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg) en ratones.

##### *Hipótesis.*

Las hipótesis de este experimento son las siguientes:

1- La administración de etanol a ratones tendrá una acción bifásica sobre su locomoción. De forma que se obtendrá una curva en la que las dosis bajas impliquen un aumento de la actividad locomotora y las altas una supresión de la misma.

2- El pretratamiento con cianamida producirá un efecto antagonista sobre la actividad locomotora que el etanol produce en ratones.



*Procedimiento experimental.*

Para ello se utilizaron 96 ratones macho, que fueron adscritos aleatoriamente a uno de los dos grupos presentes en el experimento. Así, 48 animales pasaron a conformar el grupo experimental y otros 48 el grupo control; a su vez, cada uno de los grupos, se subdividía en 8 animales por dosis de etanol y grupo.

La metodología que se llevó a cabo fue la siguiente. Los animales del grupo experimental fueron pretratados de forma aguda con una inyección i.p. de cianamida, a una dosis de 25 mg/kg, una hora y media después de esta eran pretratados nuevamente con una inyección de salina. Transcurrida media hora tras este pretratamiento, los animales fueron tratados con las diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Inmediatamente después de esta última inyección fueron situados en el aparato de campo abierto durante 20 minutos de los cuales solo los diez últimos minutos fueron evaluados para la medida de la actividad locomotora.

Por su parte, los animales pertenecientes al grupo control recibieron inyecciones i.p. de salina como pretratamiento, con los mismos intervalos temporales descritos anteriormente y como tratamiento fueron inyectados con las distintas dosis de etanol, siguiendo también el protocolo temporal anterior. Del mismo modo, fueron situados en el campo abierto para su posterior evaluación inmediatamente después de la última inyección.

En los intervalos entre inyecciones los animales eran nuevamente depositados en sus jaulas.

La dosis de cianamida (25 mg/kg) utilizada en este experimento fue seleccionada en función de estudios previos que la han utilizado con finalidades diferentes, por ejemplo en la determinación de la inhibición de la ALDH hepática o cerebral (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; LINDROS Y STOWELL, 1982), para comparar su acción con la de otros inhibidores de la ALDH (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978), en la evaluación de la toxicidad que genera el aumento de AcH, tras la ingesta de etanol, provocado por la inhibición sobre la actividad de la ALDH (HILLBOM Y OTROS, 1983), en el análisis de su acción en la conducta de ingesta de etanol (AMIT Y OTROS, 1976, 1980; SINCLAIR Y GRIBBLE, 1985; ARAGÓN Y OTROS, 1993) o en los estudios con sujetos humanos (BRIEN Y OTROS, 1979) entre otros.

La determinación de los intervalos temporales se elaboraron a partir de los datos que indicaban que la cianamida ejercía su máxima inhibición sobre la actividad de la ALDH a las dos horas de su administración (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; PEACHEY Y SELLERS, 1981; BRIEN Y OTROS, 1985) confirmada posteriormente por los datos obtenidos a nivel conductual en los que el intervalo entre administración de cianamida, tratamiento con etanol y medida posterior de la actividad locomotora fueron también de dos horas (SPIVAK Y OTROS, 1987b).

### Resultados.

En la figura 12 se presenta el efecto que el pretratamiento con cianamida o con salina tiene sobre la actividad locomotora inducida por el etanol. Así como el efecto que las diferentes dosis de etanol tienen sobre la mencionada actividad.

Para determinar si existía algún efecto estadísticamente significativo, se realizó una prueba de ANOVA para dos factores, el factor GRUPO (cianamida o salina) y el factor DOSIS (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg de etanol).

Este análisis mostró un efecto estadísticamente significativo para la INTERACCIÓN (grupo x dosis) así como para los dos factores, GRUPO y DOSIS.

Los valores obtenidos para la F fueron los siguientes:

Dosis	F (5,84)= 8.481	p < 0.000
Grupo	F (1,84)= 23.058	p < 0.000
Interacción	F (5,84)= 6.535	p < 0.000

Los resultados obtenidos en las pruebas *a posteriori* de Fisher que se realizaron a continuación indicaron que el etanol produce en la actividad locomotora de ratones una respuesta bifásica de excitación y depresión.

Las dosis que presentan diferencias significativas son:

- 0 y 1.6 g/kg de etanol.
- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0 y 4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

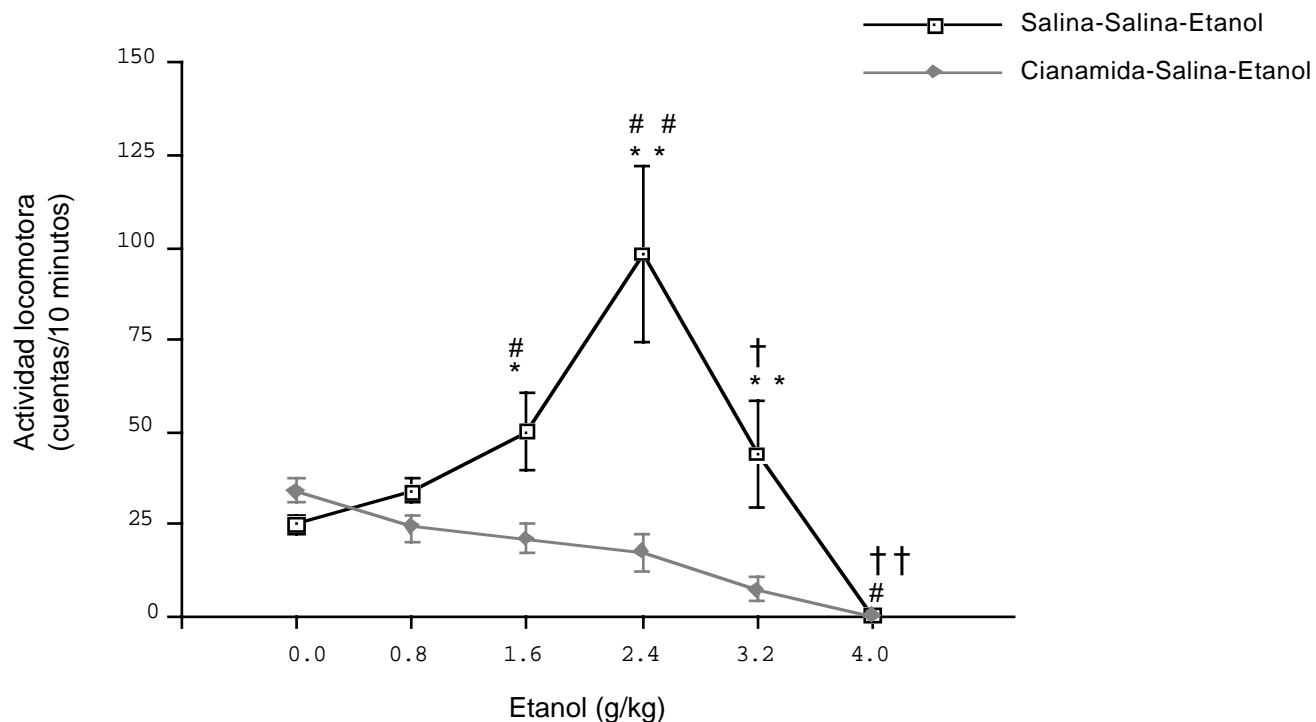
A partir de estos resultados se podría afirmar que el etanol ejerce un efecto dosis dependiente sobre la actividad locomotora en ratones medida en un campo abierto. Así, dosis intermedias (1.6 y 2.4 g/kg de etanol) provocan un aumento de la actividad locomotora, mientras que dosis más altas (3.2 y 4 g/kg de etanol) provocan una depresión de la misma, incluso por debajo de los niveles de los animales salina (0 g/kg de etanol).

Por otra parte, los resultados referidos al grupo experimental, recogidos también en la figura 12, ponen de manifiesto que la cianamida, en su interacción con el etanol, produce una disminución de la actividad locomotora inducida por etanol en el campo abierto, ejerciendo un grado de depresión que lleva a la obtención de una actividad que es para algunas de las dosis de etanol (4 g/kg) significativamente menor que la actividad locomotora espontánea de los animales, llegando incluso a la pérdida del reflejo de enderezamiento o narcosis.

Los efectos de esta interacción indican que la cianamida ejerce una depresión en la actividad locomotora, en ratones, inducida por etanol en un campo abierto.

Las pruebas *a posteriori* LSD de Fisher para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la interacción entre los dos grupos pusieron de manifiesto que se dan diferencias para las siguientes dosis: 1.6, 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.

En resumen, y a partir de los resultados obtenidos en el experimento, se podría afirmar que, por una parte, el etanol ejerce una acción bifásica de excitación y depresión, sobre la actividad locomotora en ratones y, por otra, que la cianamida a las dosis de 25 mg/kg anula la acción ejercida por el etanol.



**Fig. 12:** Efecto de la administración de cianamida o salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con cianamida (25 mg/kg) o salina dos horas antes del tratamiento con diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p< 0.01; \*p< 0.05 para las diferencias entre los grupos salina-etanol y cianamida-etanol; ##p< 0.01; #p< 0.05 para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol; ††p< 0.01; †p< 0.05 para las diferencias entre los grupos cianamida-salina y cianamida-etanol).

*Discusión.*

Como se ha comentado anteriormente, a partir del conjunto de resultados obtenidos, se podría afirmar que el etanol ejerce un efecto bifásico en la actividad locomotora que induce en ratones en un campo abierto.

Este efecto bifásico se traduce en un aumento de la actividad a dosis moderadas de etanol (1.6 y 2.4 g/kg) y una disminución de la misma cuando las dosis administradas de etanol son elevadas (3.2 y 4 g/kg).

Por otra parte, también se ha visto que la administración de cianamida (25 mg/kg) provoca, en su interacción con el etanol, un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por el etanol a diferentes dosis.

Como ya se expuso la administración de cianamida por sí misma no ejerce ningún efecto nocivo en el organismo (RIKANS, 1987). Tampoco se observan efectos aversivos si esta sustancia es administrada después o durante el curso temporal de la oxidación del etanol (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978). Sin embargo, los efectos que provoca el tratamiento con cianamida, en animales (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978, 1983; CARMICHAEL Y OTROS, 1987; RIKANS Y OTROS, 1990) o en humanos (BRIEN Y OTROS, 1979, 1980a; PEACHEY Y OTROS, 1980, 1981c; KUPARI Y OTROS, 1981; STOWELL Y OTROS, 1980, 1984) cuando es administrada antes del etanol son tóxicos, generando incluso, una REC. Esta reacción parece estar provocada por la acción inhibitoria que la cianamida ejerce sobre la actividad de la ALDH mitocondrial de baja Km (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978, 1983; LINDROS Y STOWELL, 1982; LOOMIS Y BRIEN, 1983a, b; NAGASAWA Y OTROS, 1990).

Así, el pretratamiento con cianamida genera una inhibición de este isozima de manera que cuando posteriormente se administra etanol, a sujetos humanos o a animales, se produce, en la periferia del organismo, un aumento en la concentración de AcH (BRIEN Y OTROS, 1978; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; HOOVER Y BRIEN, 1980) en sangre que produce una serie de respuestas en el organismo que son la base para la terapia farmacológica del alcoholismo (KITSON, 1977a; BRIEN Y OTROS, 1979; PEACHEY Y SHELLERS, 1981).

Por otra parte, y al igual que ocurría en los experimentos en los que se utilizó el DDTc, como planteamiento teórico frente a los efectos que produce la administración de cianamida, se puede suponer la inhibición de la actividad de la ALDH, explicación que va en la línea de lo obtenido en trabajos anteriores tanto *in vivo* (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; 1983; HOOVER Y BRIEN, 1981; DEITRICH Y OTROS, 1976; SHIROTA Y OTROS, 1985) como *in vitro* (CEDERBAUM Y DICKER, 1981; CEDERBAUM, 1981; SVANAS Y WEINER, 1985a, b).

Sin embargo, en relación a que la acumulación periférica de AcH sea o no la variable responsable de la inhibición conductual de la actividad locomotora inducida por el etanol, las posturas teóricas discrepan. Así, mientras que para unos (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978, 1983; PEACHEY Y OTROS, 1980, 1981c, 1983; HOOVER Y BRIEN, 1981) sería el aumento en la concentración de AcH en sangre, para otros (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) la explicación pasaría necesariamente por la implicación de la ALDH cerebral.

En este sentido, los resultados obtenidos sí parecen indicar una inhibición de la actividad de la ALDH por parte de la cianamida. Esta acción inhibitoria puede producir una acumulación tóxica de AcH en la periferia del organismo que impida la expresión conductual de la inducción locomotora provocada por el etanol.

La determinación de la mediación de un sistema enzimático como el propuesto de la ALDH cerebral (SINCLAIR Y LINDROS, 1981) o de la toxicidad provocada por la acumulación de AcH (PEACHEY Y OTROS, 1980, 1981c, 1983) en sangre son la parte central del experimento que se presenta a continuación.

#### **4.2.3.- Experimento nº 13.**

##### **Efecto de la interacción de la cianamida y el 4-metilpirazol (4-MP) sobre la actividad locomotora inducida por etanol.**

###### *Objetivos.*

Este experimento se realizó con el objetivo de determinar la posible implicación de la ALDH cerebral en la mediación de algunas de las conductas inducidas por etanol, en este caso, la actividad locomotora de ratones en un campo abierto.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el experimento anterior, se planteó que dado que la acción del etanol fue inhibida a nivel de expresión conductual, debido probablemente a la acumulación periférica de AcH, provocada por la acción de la cianamida sobre la ALDH, en el presente experimento se realizó una manipulación en esa concentración periférica de AcH mediante el pretratamiento con 4-MP, un inhibidor de la ADH (THEORELL Y OTROS, 1969).

### *Hipótesis.*

En función de lo anterior, se plantearon las siguientes hipótesis:

1- La acción del 4-MP provocaría un enlentecimiento en la cantidad de AcH obtenido en la oxidación del etanol, de forma que si el aumento, generado por la inhibición de la actividad de la ALDH, mediante la acción de la cianamida, en la concentración de AcH periférico está enlentecido, esto supondrá la posibilidad de observar la acción del etanol sobre la conducta locomotora.

2- En función de lo anterior, y teniendo en cuenta que la acción inhibitoria de la cianamida se produce tanto sobre la actividad de la catalasa como sobre la actividad de la ALDH, se carecía datos que permitiesen predecir la conducta posterior, aunque se esperaba que, dado que la acción sobre la ALDH sola que ejerce el DDTC (experimento nº 9) supone una inducción de la actividad locomotora inducida por etanol, en el caso del presente experimento la actividad fuera menor y quizá mayor que la observada para los animales del grupo salina-etanol, ya que aunque la catalasa estaría inhibida al estarlo también la ALDH, los niveles de AcH central serían mayores que en el caso del grupo control.

### *Procedimiento experimental.*

Para el experimento se utilizaron 96 ratones macho que fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimental y control, cada uno de ellos estaba compuesto de 48 animales. Estos fueron a su vez distribuidos en cada uno de los seis niveles de que constaba cada uno de los grupos, de forma que finalmente cada nivel contaba con 8 animales.

Los animales pertenecientes al grupo experimental recibían un pretratamiento integrado por una inyección i.p. de cianamida, a la dosis de 25 mg/kg y, una hora y media

después, otra inyección aguda de 4-MP, a una dosis de 10 mg/kg. El tratamiento se administró media hora después de esta última inyección y estaba formado por las diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Inmediatamente después del tratamiento con etanol, los ratones fueron situados, de forma individual, en el aparato de campo abierto para el registro, en la prueba conductual, de su actividad locomotora.

Los animales pertenecientes al grupo control recibieron como pretratamiento la combinación de una inyección i.p. de salina y una hora y media después recibían la inyección de 4-MP. Media hora más tarde, se les aplicaba el tratamiento integrado por la administración de etanol a diferentes dosis (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Tras este, sin ninguna mediación temporal, se situó a los animales en el campo abierto para el posterior registro de la actividad locomotora de los ratones.

En los intervalos entre inyecciones los animales eran nuevamente situados en sus jaulas.

### *Resultados.*

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. En esta, se puede observar, por una parte, la acción del 4-MP en su interacción con el etanol sobre el efecto que produce este último en la actividad locomotora y, por otra, el efecto de la acción conjunta de los dos inhibidores, cianamida y 4-MP, sobre la actividad locomotora inducida por etanol en un campo abierto.

El análisis matemático de los datos se realizó mediante una prueba de ANOVA para dos factores, el factor grupo y el factor dosis. El primero estaba formado por dos niveles (salina-4-MP-etanol y cianamida-4-MP-etanol) y el segundo por seis niveles, referido cada uno de ellos a una de las dosis de etanol administradas (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Los resultados que se derivan de la prueba indican un efecto estadísticamente significativo para el factor DOSIS.



Los valores obtenidos de F fueron los siguientes:

Dosis	F (5,84) = 12.442	p < 0.000
Grupo	F (1,84) = 0.220	p < 0.640
Interacción	F (5,84) = 1.017	p < 0.413

Los resultados obtenidos en los análisis *a posteriori*, mediante la LSD de Fisher, indicaron que el etanol produce una respuesta bifásica sobre la actividad locomotora en ratones tanto en el grupo experimental como en el grupo control.

Las dosis del grupo experimental que presentaron diferencias significativas fueron:

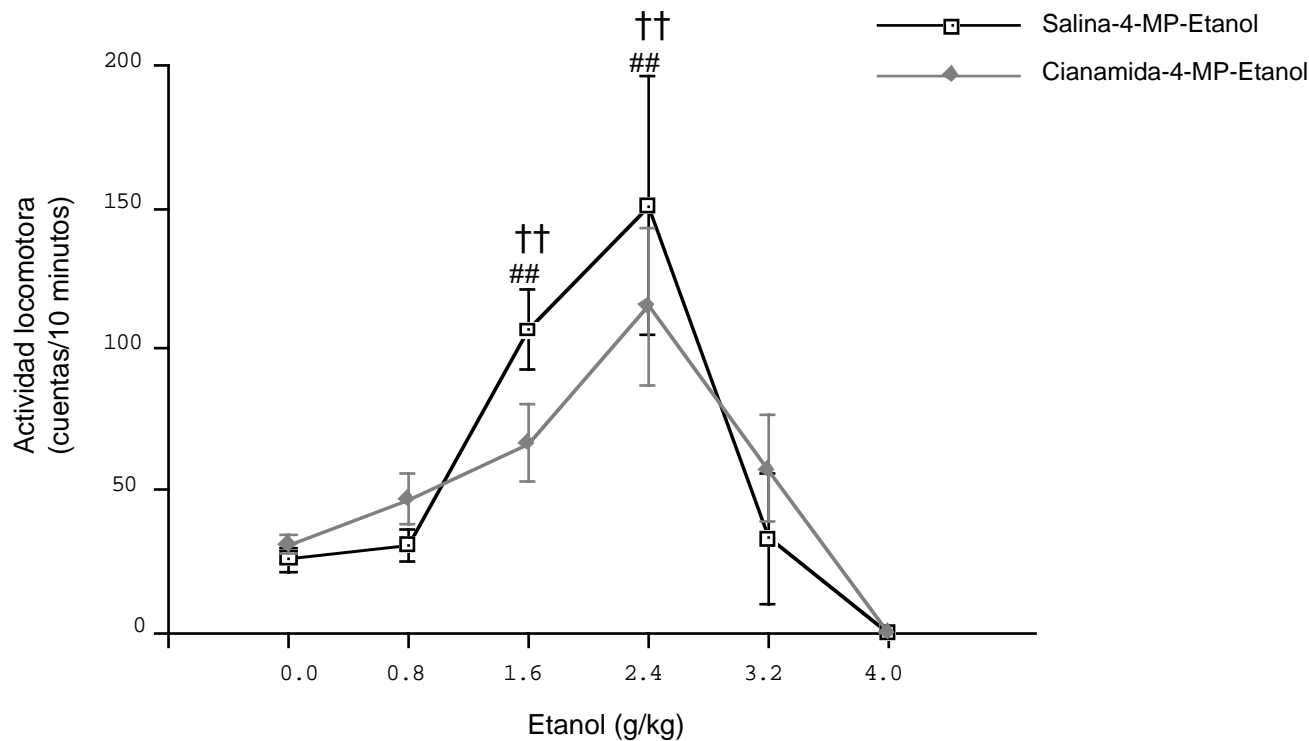
- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.
- 3.2 y 4 g/kg de etanol.

Las significaciones estadísticas para el grupo control se dieron para las siguientes dosis:

- 0 y 1.6 g/kg de etanol.
- 0 y 2.4 g/kg de etanol.
- 0.8 y 1.6 g/kg de etanol.
- 0.8 y 2.4 g/kg de etanol.
- 1.6 y 3.2 g/kg de etanol.
- 1.6 y 4 g/kg de etanol.
- 2.4 y 3.2 g/kg de etanol.
- 2.4 y 4 g/kg de etanol.

Como se recoge en la figura 13, el etanol genera en ambos grupos una curva bifásica con una parte de excitación producida por dosis medias (1.6 y 2.4 g/kg) y otra de depresión producida por dosis elevadas (3.2 y 4 g/kg).

Por otra parte y dado que los resultados obtenidos para F no indican valores significativos ni para el efecto grupo ni para la interacción entre ninguna de las dosis utilizadas para el grupo experimental y control, se podría afirmar que las curvas obtenidas, para los dos grupos, son, desde un punto de vista estadístico, similares, y aunque la curva obtenida para el grupo experimental presenta valores mayores de actividad locomotora no se dan diferencias estadísticamente significativas.



**Fig. 13:** Efecto de la administración conjunta de cianamida y 4-MP o salina sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones ( $n=8$ ) fueron pretratados i.p. con cianamida (25 mg/kg) o salina dos horas antes del tratamiento con diferentes dosis de etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar ( $##p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos salina-salina y salina-etanol;  $††p < 0.01$  para las diferencias entre los grupos cianamida-4-MP-salina y cianamida-4-MP-etanol).

*Discusión.*

En este experimento se realizó el estudio de la interacción farmacológica entre inhibidores del metabolismo del etanol y esta misma sustancia. El planteamiento que subyace a esta interacción es que la administración de sustancias que alteren la concentración de AcH en el organismo puede servir como medio de determinar la función de la ALDH cerebral en las conductas inducidas por etanol siendo en este caso la actividad locomotora la conducta analizada.

En este sentido, la administración inhibidores de la ALDH, como el disulfirán (DEITRICH Y ERWIN, 1971) o la cianamida (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; CEDERBAUM, 1981; JÄRBE Y OTROS, 1982; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982; BRIEN Y OTROS, 1985), en animales (DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1978; SHIROTA Y OTROS, 1982b; STOWELL Y OTROS, 1984; YOURICK Y FAIMAN, 1989) y humanos (MARCONI Y OTROS, 1960; COLLINS Y BROWN, 1960; BRIEN Y OTROS, 1978; 1980a; PEACHEY Y OTROS, 1980, 1983) que son tratados posteriormente con etanol, genera un aumento de la concentración de AcH en el organismo que, como se ha visto, es tóxica (BRIEN Y OTROS, 1978; PEACHEY Y OTROS, 1980; KUPARI Y OTROS, 1983; KITSON, 1991; MADAN Y FAIMAN, 1994b, 1995). Esta toxicidad podría impedir la expresión conductual de la inducción producida por la administración del etanol.

Así, la administración de 4-MP que produce una inhibición del enzima ADH (THEORELL Y OTROS, 1969), enzima que media la oxidación del etanol en el hígado (PETERSEN Y OTROS, 1983), reduciría los niveles de AcH en el organismo (LINDROS, 1975; SALASPURO Y OTROS, 1977; LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981). Esta reducción en los niveles tóxicos de AcH en la periferia del organismo no se correspondería con una reducción central dado que la ADH a nivel central tiene una mediación mínima sobre el metabolismo del etanol ( RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972; GIRI Y OTROS, 1989) por lo que existiría a nivel central una mayor concentración de AcH que se podría traducir en un aumento de la inducción generada por la administración de etanol.

En este sentido, la utilización del 4-MP en este experimento aunque, por una parte, sí parece haber producido un enlentecimiento en la oxidación del etanol mediado por la ADH, prueba de ello es la obtención de una curva bifásica en cuanto a los efectos del etanol en el grupo experimental que había sido pretratado con cianamida, por otra, y a

diferencia de los datos obtenidos en el experimento n° 9 para el DDTc, su administración no ha supuesto un aumento en la actividad locomotora inducida por etanol respecto al grupo pretratado con salina.

Esta diferencia en los resultados obtenidos podría ser atribuida a la doble acción de la cianamida ya que esta sustancia, a diferencia de otros inhibidores de la ALDH como disulfirán (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983; YOURICK Y FAIMAN, 1989; PETERSEN, 1992; JIN Y OTROS, 1994), DDTc (DEITRICH Y ERWIN, 1971; YOURICK Y FAIMAN, 1989) y nitrefazol (KODA Y OTROS, 1984; SUOKAS Y OTROS, 1985; ZORZANO Y HERRERA, 1990a, b; VERBANCK, 1995) entre otros, ejerce su efecto no solo sobre la ALDH (DEITRICH Y OTROS, 1976; CEDERBAUM, 1981; JÄRBE Y OTROS, 1982; LOOMIS Y BRIEN, 1983a) sino también sobre el enzima catalasa (SHIROTA Y OTROS, 1982a; DEMASTER Y OTROS, 1982, 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991c). Este hecho implicaría un efecto diferencial entre la acción de la cianamida y el DDTc sobre el metabolismo del etanol.

Así, los datos obtenidos indican que la cianamida ejerce su máxima acción sobre la ALDH dos horas después de su administración (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978) y que para ejercer ese efecto debe primero ser bioactivada (DEMASTER Y OTROS, 1982, 1983, 1984; SHIROTA Y OTROS, 1982a; 1996; CEDERBAUM Y DICKER, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a) a un metabolito activo (SHIROTA Y OTROS, 1987a, b; 1996; NAGASAWA Y OTROS, 1990).

El enzima encargado de mediar esa bioactivación de la cianamida es la catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a; CEDERBAUM Y DICKER, 1985) y, además, se sabe que al ejercer su acción sobre la cianamida, la catalasa es inhibida por esta misma sustancia a la que está activando (DEITRICH Y OTROS, 1976; LOOMIS Y BRIEN, 1983a).

Por otra parte, el intervalo temporal en el que la cianamida ejerce su acción inhibitoria sobre la actividad de la catalasa es de 24 horas, dándose la máxima inhibición del enzima una hora después de la administración de la cianamida (DEMASTER Y OTROS, 1986) de forma que el intervalo de tiempo (2 horas) en el que se desarrolla la medida de la actividad locomotora en el presente experimento se encuentra cercano a la máxima inhibición de la actividad de la catalasa, hecho este que explicaría los resultados obtenidos.

Además, estos resultados son congruentes con los obtenidos por otros autores (ARAGÓN Y OTROS, 1985a, b, 1989; SMITH Y OTROS, 1985; ESCARABAJAL Y OTROS, 1999) que

han informado de que el empleo de inhibidores de la catalasa como por ejemplo, AT, mediante su acción sobre la actividad de la catalasa, genera una acción antagonista sobre diferentes efectos (ARAGÓN Y OTROS, 1985a, b; SMITH Y OTROS, 1985), entre los que se encontraría la actividad locomotora inducida por etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1989; ESCARABAJAL Y OTROS, 1999).

En este sentido, los datos obtenidos, tomados en conjunto, sugieren la implicación, por una parte, de la ALDH y de la catalasa cerebral, frente a la explicación de que la acumulación periférica de AcH es el aspecto que determina los efectos psicomotores del etanol y, por otra, del acetaldehído como metabolito activo que mediaría algunos de los efectos psicofarmacológicos inducidos por etanol.

#### **4.2.4.- Experimento nº 14.**

**Efecto de la interacción del 4-metilpirazol (4-MP) con diferentes dosis de cianamida sobre la actividad locomotora espontánea y la inducida por una inyección aguda de etanol en ratones.**

##### *Objetivos.*

Los objetivos que se siguen con este experimento son similares a los recogidos en el experimento nº 10 realizado con el DDTTC. En ese sentido, se plantean dos objetivos, por una parte, y teniendo en cuenta los datos del experimento anterior (nº 13), se estudia el efecto de la interacción del 4-MP (10 mg/kg) con varias dosis de cianamida (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) y, por otra, determinar si la interacción entre ambos inhibidores modifica significativamente la actividad locomotora inducida por etanol (2.4 g/kg).

##### *Hipótesis.*

Las hipótesis planteadas son:

1- La administración conjunta de 4-MP y diferentes dosis de cianamida no ejercerá ningún efecto significativo sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones en el campo abierto.

2- La mencionada administración supondrá cambios en la actividad locomotora inducida por una dosis aguda de etanol.

*Procedimiento experimental.*

Para la realización de este experimento se utilizaron 64 animales, de los cuales 32 formaron el grupo experimental y los 32 restantes integraron el grupo control. Cada uno de los grupos contaba con cuatro niveles, uno por cada una de las dosis de inhibidor analizadas, estando compuesto cada uno de los niveles por 8 ratones.

En cuanto al protocolo experimental, los animales del grupo experimental recibieron un pretratamiento consistente en la administración de la cianamida a diferentes dosis (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) y una hora y media después eran inyectados con 4-MP (10 mg/kg), transcurrida media hora desde esa administración se les aplicaba el tratamiento que estaba integrado por una inyección aguda de etanol (2.4 g/kg).

Inmediatamente después eran situados en el aparato de campo abierto para su posterior evaluación conductual.

Por su parte, los animales del grupo control recibieron el mismo pretratamiento que los del grupo experimental mientras que el tratamiento estaba formado por la administración de una inyección de solución salina.

Durante los intervalos temporales entre inyecciones los animales eran situados en sus jaulas.

*Resultados.*

En la figura 14 se recogen los resultados obtenidos en este experimento, por una parte, la actividad locomotora de los ratones sometidos al pretratamiento con cianamida y 4-MP y, por otra, la actividad locomotora inducida por etanol en ratones pretratados con estas dos sustancias.

El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de dos factores entre sujetos, estos factores fueron el GRUPO y las DOSIS. El factor grupo presentaba dos niveles, cianamida-4-MP-salina y cianamida-4-MP-etanol. Mientras que el factor dosis lo formaban cuatro niveles, uno por cada dosis de cianamida (0, 12.5, 25, 50 mg/kg).

Los datos obtenidos en este análisis indicaron un efecto estadísticamente significativo para el factor GRUPO.

## Fase II: Efecto de la administración de cianamida y de la interacción de cianamida y 4-MP

Los valores de F que se obtuvieron fueron los siguientes:

Grupo	$F(1,56) = 26.409$	$p < 0.000$
Dosis	$F(3,56) = 0.446$	$p < 0.721$
Interacción	$F(3,56) = 0.377$	$p < 0.770$

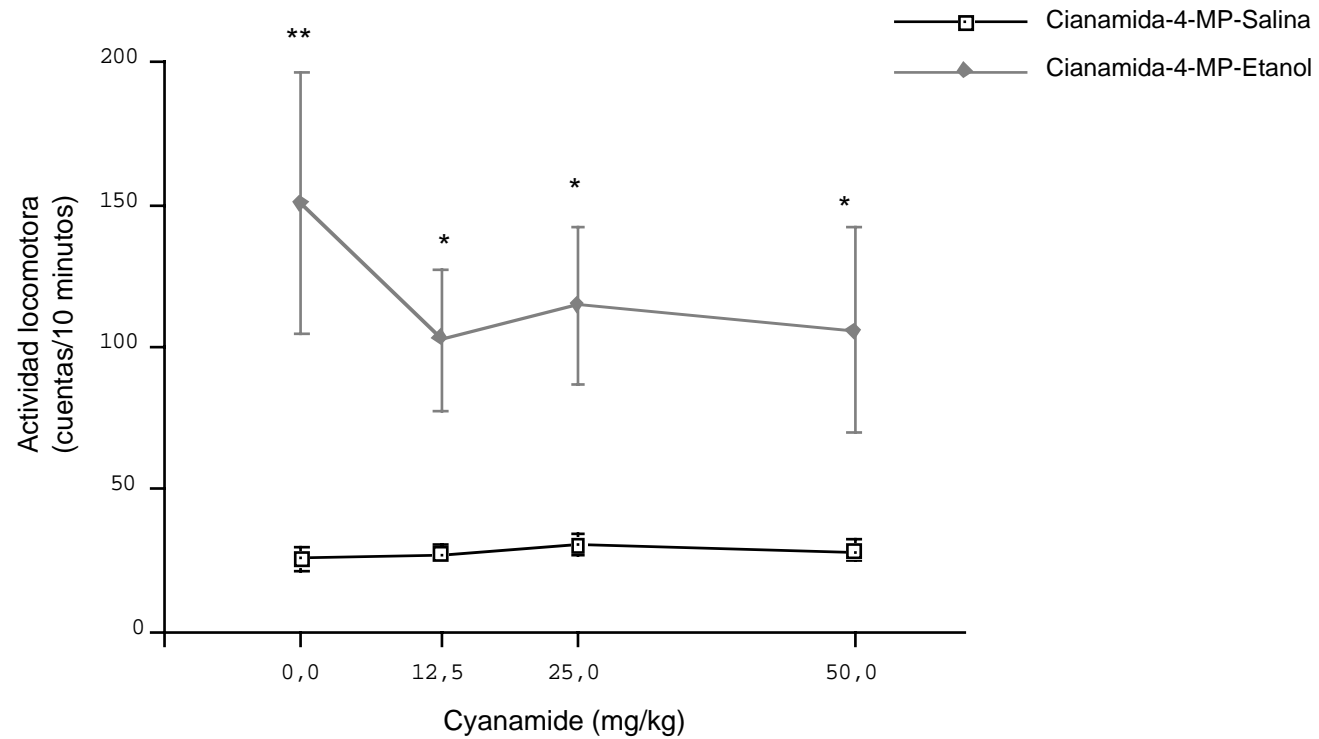
Como se recoge en el cuadro anterior, no se obtuvieron diferencias significativas ni para el efecto dosis ni para el efecto de interacción entre los dos factores.

En la figura 14 se puede observar que los datos obtenidos en los animales del grupo control muestran que la interacción de la cianamida en cualquiera de las dosis utilizadas (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) con la dosis de 10 mg/kg de 4-MP no ejerce ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los animales en el campo abierto.

Por otra parte, los resultados de los análisis *a posteriori* para el grupo experimental indicaron también una ausencia de diferencias significativas entre las diferentes dosis del inhibidor en su interacción con el 4-MP.

Así, los datos, tomados en conjunto, indican, por una parte, que la administración del 4-MP no ejerce un efecto significativo en su interacción con el pretratamiento con diferentes dosis de cianamida aspecto obtenido tanto para el grupo experimental como para el grupo control y, por otra, que solo se obtienen diferencias estadísticamente significativas para el efecto grupo, de forma que solo se logra un efecto de pertenencia a uno de los grupos tras la posterior administración de etanol.





**Fig. 14:** Efecto de la administración conjunta de diferentes dosis de cianamida y 4-MP sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones (n=8) fueron pretratados i.p. con cianamida (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) dos horas antes del tratamiento con etanol (2.4 g/kg). Los datos representan las medias y los errores estándar (\*\*p < 0.01; \*p < 0.05 para las diferencias entre los grupos DDTC-4-MP-etanol y DDTC-4-MP-salina).

*Discusión.*

La capacidad de la cianamida para inhibir la ALDH ha sido demostrada anteriormente tanto *in vivo* (DETRICH Y OTROS, 1976; AMIT Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; AMIR Y STERN, 1978; HILLBOM Y OTROS, 1983; RIKANS Y OTROS, 1990) como *in vitro* (DEMASTER Y OTROS, 1982, 1983, 1985; SHIROTA Y OTROS, 1982a), aunque en este último caso, es necesaria la presencia de mitocondria intacta (CEDERBAUM, 1981; DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; SVANAS Y WEINER, 1985a) para que se produzca la inhibición.

Como ya se ha comentado anteriormente, la inhibición de la ALDH, por la acción de la cianamida, en animales pretratados con etanol genera una acumulación periférica de AcH que es tóxica (BRIEN Y OTROS, 1978; 1980a; PEACHEY Y OTROS, 1980, 1981c; HILLBOM Y OTROS, 1983).

En este experimento se evaluó el efecto de la interacción del 4-MP con diferentes dosis de cianamida. El resultado de esa interacción en el grupo control, tratado con salina, indica que el efecto de la interacción de ambas sustancias –cianamida y 4-MP– es inocuo ya que no se observan diferencias entre la dosis 0 mg/kg de cianamida y el resto de las dosis del inhibidor; este hecho es congruente con los resultados obtenidos por otros autores que muestran que ni la administración de 4-MP (CARR Y OTROS, 1980) ni la de la cianamida (RIKANS, 1987) tienen efectos tóxicos por sí mismas. Este hecho sirve como garantía de su utilización como herramientas farmacológicas para determinar la implicación de la ALDH en las conductas inducidas por etanol.

Así, si la expresión conductual inducida por etanol en ratones queda inhibida por la administración de cianamida (experimentos n° 11 y n° 12), la administración de un tratamiento que combine cianamida con 4-MP, podría permitir un cambio en la actividad, ya sea en el sentido de aumentarla o de disminuirla, indicando de este modo la mediación del isozima de ALDH, la ALDH<sub>2</sub>, en algunas de las conductas inducidas por etanol (experimento n° 13). Este cambio estaría justificado por la acción del 4-MP sobre la ADH (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985) y por la acción de la cianamida sobre la ALDH (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; CEDERBAUM, 1981; SHIROTA Y OTROS, 1982a, b; LOOMIS Y BRIEN, 1983a).

Sin embargo, y a diferencia de los resultados obtenidos en el experimento n° 10 con el DDTc, los resultados obtenidos para el grupo experimental en este experimento no indican diferencias en la actividad locomotora entre la dosis de 0 mg/kg de cianamida y las dosis restantes de esta sustancia.

Esto indicaría, por una parte, que el tratamiento combinado de cianamida y 4-MP sí anula la inhibición conductual producida por la cianamida sobre la actividad locomotora inducida por etanol ya que no se dan diferencias entre ninguna de las dosis de cianamida utilizadas y, por otra, indica que el pretratamiento con cianamida y 4-MP no logra potenciar los niveles de actividad locomotora inducidos por etanol.

La diferencia entre los resultados obtenidos en este experimento y el correspondiente del DDTc (experimento n° 10) podrían ser explicadas en función de la diferente acción que ejerce cada una de estas sustancias en el metabolismo del etanol. Así, mientras el DDTc ejerce su efecto inhibitorio solo sobre la actividad de la ALDH (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983; YOURICK Y FAIMAN, 1989; PETERSEN, 1992; JIN Y OTROS, 1994), la cianamida no solo actúa inhibitoriamente sobre la ALDH (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; CEDERBAUM, 1981; JÄRBE Y OTROS, 1982; DEITRICH Y OTROS, 1976; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982; BRIEN Y OTROS, 1985) sino también sobre la actividad de la catalasa cerebral (SHIROTA Y OTROS, 1982a; DEMASTER Y OTROS, 1982, 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991c).

En este sentido, los datos obtenidos no son solo el reflejo de la inhibición de la ALDH por la cianamida y de la inhibición de la ADH por el 4-MP, sino que a esto habría que añadirle la acción que la cianamida ejerce sobre la catalasa de forma que aunque en la periferia del organismo se obtengan niveles de AcH deprimidos por la acción de el 4-MP (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1985), implicando que no se generen efectos tóxicos en los animales (LINDROS Y OTROS, 1981a; INOUE Y OTROS, 1984, 1985), a nivel central también se produciría una menor cantidad de AcH ya que la oxidación del etanol mediada por la catalasa (COHEN Y OTROS, 1983; ARAGÓN Y OTROS, 1991c, 1992a) estaría enlentecida y, aunque la actividad de la ALDH central también se encuentre inhibida (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976b; DEITRICH Y OTROS, 1976), implicando con ello un aumento en los niveles centrales de AcH, estos no serían lo suficientemente elevados como para implicar una potenciación del efecto que el etanol tiene sobre la actividad locomotora de ratones en un campo abierto.

Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento, al igual que los obtenidos en el experimento anterior (n° 13), muestran una mediación de los enzimas implicados en el metabolismo del etanol, frente a otros planteamientos que sugieren que es la acumulación de AcH periférica el factor que genera los cambios en la actividad locomotora inducida por etanol.

En este sentido, tanto la ALDH, o más concretamente el isoenzima ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km, como el enzima catalasa son sistemas enzimáticos que ejercen su acción mediante la regulación de la formación, por parte de la acción de la catalasa cerebral, y la degradación, mediante la acción de la ALDH cerebral, de los niveles centrales de AcH.

Este planteamiento es congruente con los datos obtenidos en diferentes conductas relacionadas con el etanol como son la ingesta de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987), la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b) y el CAS (SPIVAK Y OTROS, 1987a) entre otras.

Como forma de aunar los resultados obtenidos a lo largo de esta última fase experimental, se presentan las siguientes conclusiones.

### **4.3.- Conclusiones.**

1- La cianamida por sí sola no tiene ningún efecto sobre la deambulaci3n espont3nea de los animales.

2- La administraci3n de la cianamida, en animales tratados posteriormente con etanol, ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por el etanol en ratones.

3- El efecto de la cianamida en combinaci3n con la administraci3n de etanol supone una supresi3n de la inducci3n que esta droga ejerce sobre la actividad locomotora de los ratones en un campo abierto.

4- La administraci3n conjunta de 4-MP y cianamida, en animales tratados con etanol, supone una recuperaci3n de la actividad locomotora inducida por etanol hasta los niveles del grupo control (salina-4-MP-etanol).

5- El mencionado pretratamiento (cianamida-4-MP) no genera un aumento de la actividad locomotora inducida por etanol poniendo as3 de manifiesto la implicaci3n tanto de la catalasa como de la ALDH en los efectos psicomotores del etanol.

6- La interacci3n entre 4-MP y diferentes dosis de cianamida no supone cambios en la deambulaci3n espont3nea de los ratones.

## **TERCERA PARTE: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## I. DISCUSIÓN GENERAL.

Los sistemas enzimáticos que median la formación y degradación del AcH son fundamentales para la expresión conductual de las acciones psicofarmacológicas del etanol. Estos sistemas estarían representados por la catalasa cerebral, enzima encargado de la oxidación del etanol o lo que es lo mismo de la formación de AcH, y por la ALDH, más concretamente, la ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km, que sería el principal sistema enzimático encargado de la degradación de AcH, tanto a nivel periférico como central.

El objetivo que ha guiado la realización de esta Tesis Doctoral ha sido determinar la implicación, en el metabolismo del etanol, de una serie de sistemas enzimáticos que dieran cuenta de este y al mismo tiempo indicaran o mostraran la posible mediación del AcH como metabolito activo en una serie de acciones psicofarmacológicas que son atribuidas al etanol.

En este sentido, se han realizado experimentos enfocados a determinar, por una parte, la implicación del sistema enzimático caracterizado por la catalasa cerebral y, por otra, la participación de otro de los sistemas enzimáticos relevantes en este metabolismo, el formado por el complejo enzimático de la ALDH. Para ello se han utilizado diferentes sustancias inhibitoras que alteran la oxidación del etanol y de su primer metabolito, el AcH.

Las sustancias empleadas en este trabajo ejercían su efecto sobre los mencionados sistemas enzimáticos alterándolos en algún sentido. Así, el AT, es una sustancia que ejerce su acción sobre la catalasa inhibiéndola (HEIM Y OTROS, 1955; 1956; MARGOLASH Y OTROS, 1960; TEPHLY Y OTROS, 1961; ARAGÓN Y OTROS, 1992a), por su parte el DDTC, es uno de los metabolitos del disulfirán (FAIMAN, 1979; JOHANSSON, 1986) que actúa sobre la actividad de la ALDH ejerciendo también un efecto inhibitor (TOTTMAR Y HELLSTRÖM, 1983; YOURICK Y FAIMAN, 1989; PETERSEN, 1992; JIN Y OTROS, 1994) y, por último, la cianamida, ejerce una acción conjunta sobre ambos sistemas, inhibiendo durante su bioactivación a la catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a; CEDERBAUM Y DICKER, 1985) y, una vez activada, a la ALDH (DEMASTER Y OTROS, 1983; 1984; 1985; SHIROTA Y OTROS, 1982a); de forma que como puede observarse en los esquemas contenidos en el apéndice, la acción conjunta de estos inhibidores engloba totalmente la curva metabólica del etanol, de forma que manipulaciones farmacológicas en

uno u otro miembro de la igualdad pondrían de manifiesto la implicación de los diferentes sistemas enzimáticos que median este metabolismo.

También ha sido utilizado como herramienta farmacológica el 4-MP, un conocido inhibidor de la ADH (THEORELL Y OTROS, 1969), para que, como se comentó en los experimentos realizados con esta sustancia (experimentos nº 5 y nº 6), un exceso de AcH en la periferia del organismo, producido por la inhibición de la ALDH hepática, no enmascarase la expresión conductual de la inducción producida por el etanol sobre la actividad locomotora de los ratones en un campo abierto y que esto permitiera, en unión con la acción de los inhibidores de la ALDH, determinar, por una parte, la implicación de la catalasa y ALDH encefálicas y, por otra, la posible acción central del AcH.

En función de lo anterior, se desarrollaron una serie de fases experimentales en las que se realizó un análisis sistemático del efecto de la interacción de estas sustancias con el etanol.

Por otra parte, y teniendo en cuenta que los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral siguen una linealidad en cuanto a la curva metabólica del etanol, la exposición que se presenta a continuación mantendrá esa secuenciación.

En relación con esto, se presentará, en primer lugar, el planteamiento referido a la formación del AcH integrado, por una parte, por los datos referidos a los experimentos realizados con el AT y, por otra, por la información existente en torno al enzima catalasa. En segundo lugar se expondrán los resultados obtenidos en los experimentos en los que se han utilizado los inhibidores de la ALDH para posteriormente plantear la información referida a este último enzima. Finalmente, se comentarán los planteamientos a favor y en contra de la hipótesis que plantea que es el AcH el responsable directo de algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Así, en cuanto al estudio realizado con el AT, los cuatro primeros experimentos de este trabajo recogen los datos obtenidos en relación con la utilización del AT como inhibidor de la catalasa poniendo de manifiesto que el AT inhibe, en función de la dosis administrada, los efectos psicomotores del etanol, además, se obtiene que en los animales evaluados con salina el AT por sí solo no ejerce ningún efecto sobre la actividad locomotora espontánea de los ratones. Por el contrario, en los animales pretratados con AT que son posteriormente evaluados con etanol sí se encuentra un efecto inhibitorio dependiente de la dosis de inhibidor. En este sentido, la administración de bajas dosis de



AT no disminuye la actividad locomotora inducida por etanol mientras que esa disminución sí es obtenida con la administración de dosis moderadas y altas de AT.

Así, se ha obtenido la existencia de una interacción antagonista entre el etanol y el AT en su efecto sobre la actividad locomotora en ratones. Los datos obtenidos demuestran que el AT, a las dosis utilizadas tiene una acción bloqueadora sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Por el contrario, en los animales pretratados con salina y evaluados con las mencionadas dosis de etanol sí se produce un efecto sobre la actividad locomotora que es dependiente de la dosis de etanol administrada lo que permite la obtención de la curva bifásica que el etanol produce en la actividad locomotora de ratones. Así, dosis bajas de etanol inducen un aumento en la actividad locomotora y dosis altas tienen un efecto depresor sobre esta.

Además, también se ha obtenido que la manipulación del intervalo temporal entre el pretratamiento a los ratones con AT y la administración del etanol, muestra que el AT produce una inhibición sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Así, la inhibición inducida por el AT es máxima a las 5 horas de su inyección. A partir de ese momento, comienza una recuperación de la actividad locomotora hasta los niveles basales de la variable.

Y, finalmente, los resultados que se extraen de los estudios bioquímicos indican que, por una parte, el AT inhibe la actividad de la catalasa cerebral en un amplio rango de dosis cuando se administra 5 horas antes de la inyección de etanol y, por otra, los datos referidos a la evaluación del intervalo temporal existente entre la administración de etanol y la perfusión de los animales indican que el tratamiento con una única dosis de AT en diferentes intervalos produce también una inhibición significativa de la actividad del enzima. Obteniendo nuevamente que esta inhibición es máxima a las 5 horas de la inyección y que la actividad enzimática recupera sus valores basales después de alrededor de 20 horas de la administración del inhibidor.

Por su parte, los resultados obtenidos en el estudio correlacional realizado con los datos bioquímicos junto con los conductuales, los primeros obtenidos en el estudio sobre la inhibición de la actividad de la catalasa cerebral que produce el AT a diferentes dosis y los segundos pertenecientes a los resultados en los estudios conductuales, más concretamente, el referido al efecto que tienen diferentes dosis de AT, es decir, a la inhibición conductual que el AT ejerce sobre la actividad locomotora inducida por etanol, ponen de manifiesto una estrecha relación entre ambos parámetros.

Así, en este último estudio se ha expuesto la relación entre la locomoción inducida por etanol y la actividad de la catalasa cerebral. Esta relación se ha demostrado para diferentes dosis de AT (0.01, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25 y 0.5 g/kg) y en distintos tiempos de tratamiento (2.5, 5, 10 y 20 horas), lo que indicaría que la existencia de una menor actividad de la catalasa cerebral supone también una menor actividad locomotora en la inducción que el etanol produce sobre esa conducta.

En función de lo anterior, y dada la relación que parece desprenderse de estos resultados se podría afirmar que se da una mediación de la actividad de la catalasa en el metabolismo central del etanol.

En este sentido, los resultados presentados confirman y amplían los obtenidos en estudios anteriores (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1992a) que informaron de que el pretratamiento con AT presentaba una acción antagonista frente a diferentes efectos conductuales inducidos por etanol como la actividad locomotora (ARAGÓN Y OTROS, 1991a), el CAS (ARAGÓN Y OTROS, 1985a), la narcosis (ARAGÓN Y OTROS, 1991b), la liberación de corticosterona (ARAGÓN Y AMIT, 1987) y la letalidad (ARAGÓN Y OTROS, 1989; 1991b) entre otros. Todos estos resultados se han obtenido con diferentes cepas de ratas y ratones y, con varias dosis de etanol (PETERSEN Y OTROS, 1983; ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1992a, b).

Además, esta acción que ejerce el AT parece ser específica para el etanol ya que esta sustancia, por ejemplo, no atenúa los efectos conductuales producidos por otras drogas tales como la cocaína (ARAGÓN Y AMIT, 1993), el pentobarbital (QUINTANILLA Y OTROS, 1980) o el cloruro de litio (ARAGÓN Y OTROS, 1985a).

Por otra parte, se ha informado de que la relación entre etanol y AT es dependiente de la dosis de inhibidor utilizada (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1992a). Esta reducción dependiente de la dosis también se ha obtenido en los estudios sobre consumo de etanol, además como la administración de AT a estos animales no parece influir en la cantidad total de fluido consumido, el efecto del AT parece ser, también en este caso, específico para el etanol. Además, esta acción del AT no parece ser función de un posible efecto indirecto de esta sustancia sobre la ingesta de calorías ya que no se obtuvieron diferencias en el peso corporal entre los animales tratados con AT y los tratados con solución salina.

Del mismo modo, la acción inhibitoria del AT sobre la actividad de la catalasa cerebral es también dependiente de la dosis de AT utilizada (ARAGÓN Y AMIT, 1992; KOEHLING Y AMIT, 1994; ROTZINGER Y OTROS, 1994; TAMPIER Y OTROS, 1995).

Así, una vez puesta de manifiesto la interacción entre AT y etanol a nivel conductual, se pasará a determinar cuál es el lugar –central o periférico– en el que se produce la mencionada interacción, ya que por el momento no se conoce con seguridad. Se ha observado, por ejemplo, que en el CAS inducido por etanol, los niveles en sangre de esta droga son similares para los animales pretratados con AT y salina, por tanto se podría afirmar que las diferencias en el CAS inducido por etanol no son debidas a que las cantidades de etanol que actúan en el cerebro sean diferentes (ARAGÓN Y OTROS, 1985a).

El AT tampoco afecta los niveles plasmáticos de un amplio rango de dosis de etanol (0.8, 1, 1.2, 1.6, 2, 3.2, 4 g/kg). De hecho, no se obtienen diferencias significativas en los niveles sanguíneos de etanol entre los animales pretratados con AT o salina (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1989), con independencia de la dosis de etanol y el tiempo en el que se efectúa la evaluación.

Estos datos sugieren que las alteraciones que produce el AT en las conductas inducidas por etanol, son debidas a alguna influencia directa a nivel central, posiblemente por su acción en la actividad de la catalasa cerebral (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1989; 1992b).

Por otra parte, los estudios realizados sobre la acción del AT en la catalasa hepática, renal y cerebral, señalan que la interacción se produciría a nivel central. En este sentido, aunque existen datos sobre la inhibición que el AT produce *in vivo* sobre la actividad de la catalasa hepática (HEIM Y OTROS, 1955; 1956; FEINSTEIN Y OTROS; 1958), los estudios que han usado este inhibidor muestran que esta sustancia no disminuye ni enlentece el metabolismo del etanol *in vivo*, en función de esto se podría afirmar que la catalasa hepática probablemente no desempeña un papel importante en el metabolismo del etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1992a, b).

Por su parte, Cohen y otros, (1983) han mostrado que los niveles de AT en el hígado de rata tras una inyección i.p., son máximos a los 30 minutos y, a partir de ese momento empiezan a declinar. Además, estos autores también obtuvieron que, en contraste con el hígado, las concentraciones de AT en el cerebro parecen ser estables durante dos horas.

También se ha demostrado la existencia de una inhibición del 82-90% de la actividad de la catalasa en el cerebro de rata 5 horas después de la administración de AT (1 g/kg) (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1991c).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado la relación entre catalasa y consumo de etanol. La actividad de la catalasa cerebral correlaciona positivamente con el consumo voluntario de etanol. Para la catalasa hepática, sin embargo, sólo se ha obtenido un papel moderado tras la administración de dosis altas de etanol. Por esto se podría afirmar que la actividad de la catalasa cerebral puede determinar, al menos en parte, los niveles de ingesta de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1985a; 1991a).

Los estudios realizados con diferentes cepas de ratones también nos indican que las diferencias observadas en la conducta motora, entre los ratones normales y acatalasémicos, no se pueden atribuir a niveles de etanol diferentes. Ya que no se observan diferencias entre las dos cepas en los niveles sanguíneos de etanol cuando se evalúa a los ratones con la misma dosis de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1992b). En función de lo anterior, se podría plantear que las diferencias obtenidas no son debidas a factores periféricos mediados, por ejemplo, por el metabolismo hepático del etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1992a, b).

Además, también la prevención de la inhibición de la catalasa cerebral *in vivo*, por AT u otros inhibidores, previa administración de etanol, constituye una evidencia indirecta para la oxidación del etanol a AcH en el cerebro de rata (ARAGÓN Y OTROS, 1985a).

Por su parte, los datos experimentales que nos indican una interacción entre AT y los efectos del etanol en distintas conductas como la actividad locomotora y la narcosis, entre otras, sugieren que la interacción entre AT y etanol se da en un lugar fisiológico fundamental para la expresión de algunas de las conductas inducidas por etanol.

De este modo, en función de los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, se podría sugerir que la inhibición de la actividad locomotora en el campo abierto obtenida en los experimentos nº 1 y nº 2, podría deberse al efecto de la inhibición del AT sobre la actividad de la catalasa cerebral.

En este sentido, en algunos estudios se ha demostrado un decremento del 85-95% en la actividad de la catalasa cerebral respecto del grupo salina, 4 horas después de la inyección i.p. de AT (ARAGÓN Y OTROS, 1989), tanto en ratas como en ratones. Por otro lado, los estudios realizados con diferentes cepas de ratas y ratones indican que en los animales pretratados con AT y en aquellos que están desprovistos funcionalmente de la actividad de la catalasa cerebral –ratones acatalasémicos– aparece un bloqueo o inhibición significativa de varios efectos conductuales inducidos por etanol. Entre estos efectos están

el CAS a la sacarina inducido por inyecciones de alcohol (ARAGÓN Y OTROS, 1985a) y los niveles en plasma de corticosterona inducidos por etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1987).

Al igual que en la presente investigación, la ausencia de efecto sobre la actividad locomotora, por parte del AT, ha sido también obtenida por otros autores, así, han informado de la ausencia de efecto del AT sobre la deambulación espontánea de ratas (ARAGÓN Y OTROS, 1989) y de ratones (ARAGÓN Y OTROS, 1989; ARAGÓN Y AMIT, 1993). Sin embargo, cuando se administra etanol, la inhibición de la catalasa por el AT podría ser el factor que modificara las conductas inducidas por etanol. Esta idea está apoyada por los resultados obtenidos en los estudios sobre ingesta voluntaria de etanol, en los que se demuestra una relación significativa entre la actividad de la catalasa cerebral y la preferencia por etanol y actividad de la catalasa cerebral y el consumo de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; AMIT Y ARAGÓN, 1988; KOEHLING Y AMIT, 1994). En este sentido, Koechling y Amit (1994), observaron que el AT redujo significativamente el consumo y la preferencia de etanol en ratones pertenecientes a la cepa Swiss-Webster. La administración de AT dio lugar a un decremento en el consumo voluntario de etanol en concentraciones del 10 y 15% pero el AT no afectó la ingesta de etanol a concentraciones por debajo del 5%, del mismo modo el AT atenuó la preferencia por el etanol a concentraciones del 10 y 15%, pero no a concentraciones por debajo del 5%.

Los resultados obtenidos tras el pretratamiento con AT indican una disminución del consumo voluntario de etanol. Así, en ratas de la cepa UChB, que presentan un consumo de etanol elevado, cuando son pretratadas con AT muestran que el consumo voluntario de etanol también se reduce (TAMPIER Y OTROS, 1985). Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Aragón y Amit (1992), que mostraron que la inhibición de la catalasa cerebral por el AT genera un decremento dependiente de la dosis en un patrón establecido de consumo de etanol, y por Koechling y Amit (1992), que observaron un decremento del consumo voluntario de etanol en ratones.

Por otra parte, se sabe que las cepas de ratones C57BL/6 y DBA/2 difieren en la actividad de la catalasa, en su nivel de consumo voluntario de etanol y en su sensibilidad a los efectos del etanol en diferentes conductas (ARAGÓN Y AMIT, 1987). Y se considera, además, que la diferente actividad de la catalasa cerebral –los C57BL/6 poseen un 35% menos que los DBA/2– podría ser uno de los mecanismos subyacentes a la diferente sensibilidad que presentan ambas cepas de ratones. En este sentido, algunos estudios han mostrado diferencias similares entre las cepas C57BL/6 y DBA/2, y ratas tratadas con AT y su correspondiente grupo control. Estos datos apoyan la noción de que las diferencias

entre las dos cepas de ratones, C57BL/6 y DBA/2, pueden estar mediadas por niveles diferentes en la actividad de la catalasa cerebral. También se sabe que el etanol induce la liberación de corticosterona en ambas cepas aunque es mayor para los ratones DBA/2, y que la inhibición de la catalasa cerebral por AT produce una atenuación en la respuesta de la corticosterona en ambas cepas. Estos resultados están en la misma dirección que los obtenidos con ratas (ARAGÓN Y OTROS, 1985a).

Por otro lado, los estudios sobre actividad locomotora muestran que los ratones normales presentan una mayor actividad locomotora que los ratones acatalasémicos para diferentes dosis de etanol (ARAGÓN Y OTROS, 1992b). Sin embargo, no se observan diferencias en la actividad locomotora espontánea en un campo abierto entre ambas cepas de ratones y, ya que estos ratones difieren fenotípicamente en sus actividades catalíticas, de ello se sigue que la catalasa no parece tener un papel en la actividad locomotora espontánea de estos ratones. Además, tras la administración de AT a ratones normales y acatalasémicos, se genera una disminución en la actividad locomotora siendo ese efecto específico para el etanol, ya que el AT no afectó la actividad motora en ambas cepas tras el tratamiento con cocaína (2,4 mg/kg) (ARAGÓN Y AMIT, 1993). Y, sin embargo, las diferencias observadas en la conducta motora entre los dos grupos de ratones no pueden ser atribuidas a la presencia de diferentes niveles de etanol periférico porque no se observaron diferencias entre las dos cepas en los niveles sanguíneos de etanol cuando se evaluó a los ratones con la misma dosis de etanol.

También, estudios *in vitro* en los que se incubaron homogenados cerebrales de ambas cepas –normales y acatalasémicos– con etanol, han demostrado diferencias significativas en la cantidad de AcH generado (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

En relación con esto, es importante tener en cuenta que el AT inhibe la actividad catalítica pero también la actividad peroxidativa de la catalasa. Además, dada la interacción, tanto a nivel conductual como bioquímico, entre la actividad de la catalasa y el etanol, es posible sugerir que el papel de la catalasa sobre los efectos del etanol, se produce a través de su habilidad para oxidar etanol en el tejido cerebral.

En este sentido, se ha demostrado en el cerebro la presencia del peróxido de hidrógeno necesario para la oxidación del etanol por la catalasa (ARAGÓN Y OTROS, 1991c).

Así, los datos sugieren que existe una competición entre el etanol y los inhibidores de la catalasa, al mismo tiempo que confirman la presencia y generación de peróxido de

hidrógeno en el cerebro de rata *in vivo* y, todo en conjunto, parece apoyar la idea de que el AcH formado centralmente vía la catalasa cerebral puede ser responsable de algunas de las acciones farmacológicas del etanol.

Por otra parte, los estudios realizados con homogenados cerebrales han demostrado la capacidad de estos para oxidar etanol a través del sistema catalasa- $H_2O_2$  (ARAGÓN Y OTROS, 1986; 1991c). También, se ha demostrado (ARAGÓN Y OTROS, 1992a) que el etanol puede ser metabolizado en el cerebro de ratas, vía la actividad peroxidativa de la catalasa. La formación de AcH durante la incubación con etanol de homogenados cerebrales de rata fue incrementada significativamente tras la adición de glucosa oxidasa, un conocido generador de  $H_2O_2$  en presencia de glucosa. La adición al medio de incubación de distintas concentraciones de AT, 20 minutos antes que el etanol, generó un decremento dependiente de la dosis de AT utilizada en la producción de AcH, en presencia y en ausencia de glucosa oxidasa (ARAGÓN Y OTROS, 1992a).

Por su parte, los estudios (ARAGÓN Y OTROS, 1992a) realizados para determinar el efecto de la ADH y del citocromo P-450 indicarían que estos sistemas pueden ser excluidos del metabolismo del etanol, ya que la presencia de pirazol, un inhibidor de la ADH, o de metirapona, un inhibidor del citocromo P-450, siguiendo el proceso anterior, no alteraron la cantidad de AcH generado. Por el contrario, la inhibición *in vivo* de la catalasa cerebral por el AT o por la cianamida dio lugar a un significativo decremento del AcH obtenido tras la incubación con etanol de los homogenados de ratas tratadas con estos inhibidores.

Y, nuevamente, las investigaciones realizadas utilizando ratones de distintas cepas –normales y acatalasémicos– muestran también que cuando se incubaron homogenados cerebrales de ambas cepas con etanol, se observaron diferencias significativas en la cantidad de AcH generado, ya que aunque en los homogenados de ambas cepas se formó AcH, un incremento en las dosis de etanol no supuso un aumento significativo en la concentración de AcH generado en los homogenados pertenecientes a los ratones acatalasémicos. Por el contrario, en los ratones normales sí se obtuvieron niveles mayores en las cantidades de AcH generado tras la administración de etanol (ARAGÓN Y AMIT, 1993).

Así, el conjunto de todos estos datos podría indicar la existencia de un metabolismo central del etanol vía el enzima catalasa. Y, en este sentido, los datos que se presentan a continuación prosiguen la línea argumentativa anterior pero en este caso desde la otra parte

de la curva metabólica, aquella mediada por la ALDH. Para ello se expondrán los resultados obtenidos mediante la utilización del DDTC y la cianamida, además en este último caso se recogen también los datos que evidencian la relación existente entre la cianamida y el enzima catalasa.

En primer lugar se expondrán los resultados obtenidos con el 4-MP, que como ya se comentó anteriormente es una sustancia que ha sido utilizada en este trabajo como una herramienta farmacológica en los experimentos realizados con los inhibidores de la ALDH, el DDTC y la cianamida.

En este sentido, los experimentos realizados con el 4-MP estaban orientados a determinar si existía algún efecto mediado por su administración en la actividad locomotora inducida por etanol. En función de lo anterior, se llevaron a cabo los experimentos nº 5 y nº 6, en los que esta sustancia se analizaba, en diferentes intervalos temporales correspondientes al protocolo temporal de cada uno de los inhibidores de la ALDH, en conjunción con, por una parte, la administración de salina y, por otra, la de etanol.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con 4-MP ponen de manifiesto la inocuidad de su utilización como herramienta sobre la actividad locomotora espontánea, es decir, su administración no generó ningún efecto sobre la mencionada conducta siendo los resultados obtenidos similares a los que se dieron tras la administración de la solución salina. Así, la curva de actividad locomotora inducida por etanol (figuras 5 y 6) en los animales pretratados con 4-MP fue similar desde un punto de vista estadístico a la obtenida para los animales pretratados con salina.

Además, habría que tener en cuenta que la manipulación realizada con el 4-MP se llevó a cabo en diferentes intervalos temporales, los cuales estaban determinados por los protocolos de tiempo en cuanto a la administración de sustancias que seguían los experimentos con los inhibidores del enzima ALDH, este hecho, serviría para consolidar, permitir y justificar su utilización como herramienta farmacológica en los experimentos posteriormente realizados. Por otra parte, estos resultados son congruentes con los obtenidos por otros autores (SVENSSON Y WALDECK, 1973; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) que también utilizaron esta sustancia en la evaluación de la actividad locomotora sin encontrar que tuviera ningún efecto por sí misma sobre la mencionada conducta.



Por otra parte, también se sabe que el 4-MP, a las dosis utilizadas en este estudio, no afecta los niveles periféricos de etanol en sangre (SPIVAK Y OTROS, 1987a) lo cual permite afirmar nuevamente que las variaciones observadas a nivel conductual no están mediadas por un aumento en los niveles disponibles de etanol en la periferia del organismo.

A continuación se presentan los datos referidos a los experimentos realizados con los inhibidores de la ALDH, el DDTC y la cianamida.

En este sentido, los datos obtenidos en los experimentos realizados con el DDTC y la cianamida muestran la inocuidad de ambas sustancias, a las dosis utilizadas (experimentos n° 7 y n° 11). Así, la curva de actividad locomotora obtenida tras la administración de estas sustancias y el tratamiento posterior con salina indica que no existen diferencias entre los valores de actividad para la dosis 0 mg/kg de los inhibidores y las restantes dosis utilizadas de estas sustancias.

También puede observarse la mencionada inocuidad de estas sustancias sobre la deambulación de los ratones en los experimentos en los que se realiza el pretratamiento combinado de 4-MP junto con diferentes dosis de cada uno de estos inhibidores (experimentos n° 10 y n° 14).

Los resultados sobre la inocuidad de estas sustancias están también recogidos en diferentes estudios en los que se ha analizado el papel del DDTC o de la cianamida. Así, un estudio realizado para determinar la similitud entre el disulfirán y algunos de sus metabolitos, entre ellos el DDTC (YOURICK Y FAIMAN, 1989) indicó una ausencia de toxicidad por parte de este metabolito. Por otra parte, también en estudios realizados con la cianamida se obtienen resultados similares a los anteriores demostrando que la cianamida tras una administración i.p. no es hepatotóxica por sí misma (RIKANS, 1987, SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987b).

En cuanto a los resultados referidos a la acción de estas sustancias sobre la actividad de la ALDH, se ha obtenido que con ambas se produce una interacción antagonista cuando se administran con anterioridad al etanol, encontrando por ello una disminución en la actividad locomotora inducida por el etanol, siendo esta disminución dependiente de la dosis del inhibidor.

Así, en los experimentos n° 7 y n° 11, se obtuvo una clara inhibición de la actividad locomotora inducida por etanol tras el pretratamiento con DDTTC o cianamida, obteniéndose valores, en el caso de la cianamida, incluso por debajo de los controles.

Esta interacción antagonista entre el etanol y los inhibidores de la ALDH se puede observar también en aquellos experimentos en los que estas sustancias produjeron una disminución de la actividad locomotora cuando los animales fueron pretratados con una única dosis de inhibidor y para todas las dosis de etanol utilizadas (experimentos n° 8 y n° 12), obteniéndose una completa anulación de la curva bifásica que el etanol produce en la locomoción de ratones, que en el caso de la cianamida llegó a producir narcosis en los animales.

En relación con esto, las conclusiones extraídas de los experimentos n° 8 y n° 12 confirman los resultados anteriores, ya que indican que ambas sustancias, el DDTTC y la cianamida, ejercen su acción inhibitoria a lo largo de toda la curva que generan las diferentes dosis de etanol. Así, los datos demuestran que la inhibición no se produciría para una única dosis de etanol sino que con independencia de las dosis evaluadas estos dos inhibidores producen un efecto antagonista sobre esta acción del etanol.

En función de estos resultados, se podría afirmar que ambas drogas ejercen, *in vivo*, un efecto inhibitorio sobre la actividad locomotora inducida por etanol que es dependiente de la dosis de inhibidor utilizada, así, mayores dosis de inhibidor suponen una mayor inhibición de la actividad locomotora generada por el etanol.

Los resultados obtenidos son congruentes con los referidos a la acción que el disulfirán y algunos de sus metabolitos tienen sobre la ALDH. En este sentido se ha informado (MADAN Y FAIMAN, 1994b; HART Y FAIMAN, 1994) de que el disulfirán produce una inhibición de la ALDH 8 horas después de su administración y dado que el pico en la concentración de AcH es máximo entre media hora y dos horas después de la administración del etanol (HART Y FAIMAN, 1994; MADAN Y FAIMAN, 1995), podría afirmarse que esta acumulación periférica de AcH es la responsable de la disminución de la actividad locomotora obtenida en este experimento debido a sus efectos tóxicos.

Los datos para la cianamida van en la misma línea, así, Spivak y otros (1987b) obtuvieron una inhibición de la acción locomotora del etanol en ratas tras el pretratamiento con cianamida. Para ratones los datos son similares, así, se informó de que el pretratamiento con diferentes dosis de cianamida producía también una disminución de la

actividad locomotora en forma dependiente de la dosis de inhibidor (SANCHIS-SEGURA, 1997). Esta modificación de los niveles locomotores puede ser atribuída al aumento de los niveles periféricos de AcH que se producen en el organismo tras la inhibición que la cianamida produce sobre la ALDH (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978; LAMBOEUF Y DE SAINT BLANQUAT, 1980; NAGASAWA Y OTROS, 1986).

Por su parte, los experimentos n° 9 y n° 13, en los que se empleó la interacción entre, una vez determinada su inocuidad (experimentos n° 1 y n° 2), el 4-MP y los dos inhibidores anteriores, indican que el 4-MP previene la acumulación periférica de AcH producida por la acción de los dos inhibidores de la ALDH, cianamida y DDTC, ya que, nuevamente se obtiene una curva bifásica a partir de la administración de etanol, hecho que no se encontró en los experimentos en los que los ratones fueron pretratados con cianamida o DDTC y tratados posteriormente con etanol. Sin embargo, este efecto del etanol, sí se obtuvo en esos mismos experimentos (n° 8 y n° 12), cuando el pretratamiento implicaba a la salina, con independencia de las diferencias entre los protocolos temporales utilizados.

En función de esto, se podría afirmar que el tratamiento combinado de inhibidores de la ADH, como el 4-MP, junto con inhibidores de la ALDH, como cianamida o DDTC, provoca una atenuación o anulación de la acción que estas dos últimas sustancias producen sobre la expresión conductual del etanol en la actividad locomotora.

En consonancia con estos datos, se ha informado de que la acumulación periférica de AcH, tras la administración de etanol, que la acción de la cianamida genera por la inhibición de la actividad de la ALDH, disminuyen cuando se pretrata a los animales con 4-MP (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCALIR Y OTROS, 1980; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b).

Así, el tratamiento combinado de 4-MP y cianamida, con anterioridad a la administración de etanol redujo la acumulación periférica de AcH en ratas (SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b).

Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se puede extraer un dato incluso más relevante, este resultado hace referencia al incremento obtenido en la actividad locomotora inducida por el etanol.

En este sentido, la administración combinada de 4-MP y DDTC no solo provoca una atenuación de la inhibición, que esta última sustancia ejerce sobre la locomoción inducida por etanol, sino que se obtiene una inducción de esa locomoción por encima de los valores obtenidos por los animales pertenecientes al grupo control, es decir, los pretratados con salina y 4-MP y tratados posteriormente con etanol.

En cuanto a la cianamida, aunque también se obtiene una reducción en la inhibición producida sobre la expresión conductual ejercida por el etanol no se obtuvo una inducción estadísticamente significativa de esta actividad por encima de los obtenidos por el grupo control.

Estos datos tomados en conjunto apoyarían de manera indirecta la implicación de la ALDH cerebral en el metabolismo central del etanol.

Así, aunque la inhibición que el 4-MP ejerce sobre la actividad de la ADH periférica supone una anulación de los niveles periféricos de AcH, a nivel central la importancia de este efecto es menor ya que la ADH tiene una mediación mínima en el metabolismo del etanol a nivel central (RASKIN Y SOKOLOFF, 1970; 1972).

Por otra parte, también existen datos de que la acción que el DDTC ejerce sobre la actividad de la ALDH se produce tanto a nivel periférico (MADAN Y FAIMAN, 1995) como central (FAIMAN Y OTROS, 1980; HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982).

La conjunción de estos dos bloques de resultados permitiría plantear la idea de que dado que la acción del DDTC sobre la ALDH provoca un aumento en la concentración de AcH a nivel periférico este aumento se obtendría también a nivel central. Así, mientras que la acción del 4-MP sobre la ADH periférica supondría una reducción de los niveles periféricos de AcH, estos niveles no estarían afectados significativamente a nivel central. En función de este posible aumento obtenido centralmente, por la acción inhibitoria del DDTC sobre la ALDH, y mediante el efecto del 4-MP anulando el AcH periférico se podría observar la expresión conductual del efecto que el etanol ejerce.

Por lo tanto, y dado que se obtiene una inducción de la actividad locomotora inducida por etanol, esto se podría atribuir al posible aumento de AcH en el cerebro.

En este sentido, los resultados podrían indicar una mediación del AcH central en la mediación de algunos de las acciones psicofarmacológicas atribuidas al etanol. En este

caso, los datos sugerirían la mediación del AcH en la actividad locomotora inducida por etanol en un campo abierto.

En apoyo de la anterior afirmación están también los resultados obtenidos en los experimentos con cianamida (experimento n° 13). Como ya se comentó, en este caso, los resultados obtenidos tras la administración del tratamiento combinado de cianamida y 4-MP, con anterioridad a la administración de etanol, suponen que el acúmulo periférico provocado por el inhibidor de la ALDH estaría anulado gracias a la acción del 4-MP lo que permitiría la expresión conductual de las acciones del etanol.

Sin embargo, en este caso el aumento de la actividad locomotora obtenida en para el DDTC (experimento n° 9) no se produce, obteniendo por el contrario una actividad locomotora inferior a la anterior pero superior a la de los animales pertenecientes al grupo control (ver figura 15, pág. 290).

Este resultado se explicaría en función del patrón diferencial de inhibición que presentan el DDTC y la cianamida ya que el DDTC solo ejerce su acción sobre la actividad de la ALDH mientras que la cianamida afectaría también a la actividad del enzima catalasa. Así, como ya se ha expuesto, en el primer caso, el DDTC en conjunción con la acción del 4-MP genera una inducción de la actividad locomotora inducida por etanol, mientras que, en el caso de la cianamida debido a su doble inhibición solo se obtiene una anulación de la inhibición que se observa a nivel conductual. De este modo, la inhibición de la actividad de la ALDH supondría también un aumento central de AcH pero, en este caso, como también estaría inhibida la actividad de la catalasa central, el metabolismo del etanol estaría, como en el caso del AT (experimentos n° 1 y n° 2), anulado o enlentecido por lo que la inhibición de la ALDH supondría una acumulación central de AcH mayor que en el grupo pretratado con salina y 4-MP pero menor que en el grupo que recibe el pretratamiento con DDTC y 4-MP.

Así, el conjunto de estos resultados también va en apoyo de la idea que plantea la mediación, por una parte, de la catalasa y, por otra, de la ALDH en el metabolismo central del etanol.

Esta idea ha sido propuesta anteriormente por otros autores (SINCLAIR Y LINDROS, 1981, 1984; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b). En este sentido, como alternativa a que el aumento de los niveles de AcH en sangre fueran los responsables de la alteración de las conductas inducidas por etanol, se ha propuesto que tanto la catalasa

como la ALDH cerebrales son los sistemas enzimáticos que ejercerían la mediación de los cambios observados.

Así, por ejemplo, la administración conjunta de cianamida y 4-MP provocó en ratas el mismo resultado que la administración de cianamida y salina, obteniendo en ambos casos una disminución de la actividad locomotora inducida por etanol que no podría explicarse mediante la acumulación periférica de AcH ya que en el primer grupo estaba anulada por la acción del 4-MP sobre la ADH (SPIVAK Y OTROS, 1987b). A partir de lo cual se plantea la implicación tanto de la catalasa como de la ALDH cerebrales en el metabolismo del etanol.

Por su parte, los experimentos n° 10 y n° 14 se realizaron para determinar si el efecto de la interacción entre 4-MP y los inhibidores de la ALDH, DDTC y cianamida, se mantenía o variaría con la utilización de diferentes dosis de los inhibidores de ALDH.

En primer lugar, como ya se expuso, la interacción entre 4-MP y cualquiera de las dosis de los inhibidores no produjo efectos sobre la deambulaci3n espontánea de los ratones, indicando la inocuidad de su administraci3n.

En segundo lugar, los resultados indicaron también que en los dos experimentos la interacci3n entre 4-MP y diferentes dosis de los inhibidores de ALDH producía nuevamente una anulaci3n de la inhibici3n producida por DDTC y cianamida sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

Sin embargo, los datos para cada inhibidor fueron diferentes, así, mientras que para el DDTC se obtuvieron diferencias con el grupo tratado con soluci3n salina, generando una potenciación de la actividad locomotora inducida por etanol; para la cianamida no se dieron diferencias entre ninguna de las dosis, por lo que aunque se anuló la inhibici3n que produce la administraci3n combinada de cianamida y etanol, no se produjo ningún tipo de inducci3n sobre su acci3n.

Estos resultados, debido a que se obtuvieron con diferentes dosis de DDTC y cianamida, permiten de nuevo apoyar y confirmar el planteamiento de una implicaci3n de la catalasa y de la ALDH cerebrales en el metabolismo del etanol.

A modo de resumen, podría plantearse que, dado que estas sustancias, AT, DDTC y cianamida, no presentan por sí mismas ningún efecto sobre la deambulaci3n espontánea de

los animales, en un campo abierto, la acción que resulta de su administración se estaría produciendo sobre circuitos implicados en la mediación de las conductas inducidas por etanol.

Y, como ya se ha expuesto a lo largo de esta Tesis, estos circuitos estarían integrados por la catalasa y la ALDH cerebrales.

Además, y en apoyo de lo anterior, existen numerosos estudios (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) que apuntan, de forma directa, a una implicación fundamental de la ALDH cerebral sobre la oxidación del etanol e, indirectamente, a la relevancia del AcH en algunas de las acciones inducidas por etanol.

En relación con esto, hay diversos experimentos que ponen de manifiesto la relación entre la cianamida y el enzima catalasa. Así, la ya comentada bioactivación por la catalasa de la cianamida al tiempo que esta acción induce la inhibición del enzima arroja datos en este sentido (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985; SVANAS Y WEINER, 1985a; CEDERBAUM Y DICKER, 1985).

También los estudios realizados tanto *in vivo* (DEMASTER Y OTROS, 1983; 1984) como *in vitro* (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; 1985; SHIROTA Y OTROS, 1982a) para determinar el grado de inhibición que la cianamida ejerce sobre la ALDH, indican la mediación de la catalasa en la bioactivación de la cianamida.

Además, esta mediación se ha demostrado también mediante el uso de inhibidores de la catalasa como el AT y la azida sódica (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985) o el malonato (SVANAS Y WEINER, 1985a), en estos estudios se obtuvo una inhibición de la bioactivación de la cianamida *in vitro* por parte de la azida sódica y el malonato e *in vivo* por parte del AT.

Asimismo, los datos obtenidos (DEMASTER Y OTROS, 1984) indican que la administración conjunta de AT (1 g/kg) y cianamida (0.22 mmol/kg i.p.) produce una inhibición de la actividad de la catalasa hepática de los animales a los que se les da AT (1 g/kg) más cianamida (0.22 mmol/kg i.p.) un 30% mayor que la que produce la administración de cianamida sola.

También se ha obtenido (DEMASTER Y OTROS, 1985) que el AT atenúa en forma dependiente de la dosis el aumento que se produce, tras el pretratamiento con cianamida, en los niveles de AcH en sangre posteriores al tratamiento con etanol (MARCHNER Y

TOTTMAR, 1976a, b; 1978; DEITRICH Y OTROS, 1976; BRIEN Y OTROS, 1978; 1980a; CEDERBAUM, 1981; SHIROTA Y OTROS, 1982b; STOWELL Y OTROS, 1984; CARMICHAEL Y OTROS, 1987). Mientras que este mismo inhibidor no presenta ningún efecto cuando no se administra etanol (DEMASTER Y OTROS, 1985).

Los datos obtenidos a nivel conductual son similares, así, la administración conjunta de AT y cianamida supuso una reducción estadísticamente significativa de la actividad locomotora inducida por etanol respecto al grupo pretratado con cianamida (SANCHIS-SEGURA, 1997).

En este sentido, y como señalan DeMaster y otros (1985), la similitud entre la cianamida y el AT, en cuanto a la inhibición *in vivo* de la catalasa hepática, indicaría que la cianamida es un inhibidor de la catalasa similar al AT. Sin embargo, entre ambas sustancias existe una diferencia relevante ya que la cianamida, cuando es bioactivada por la catalasa, inhibe también a la ALDH *in vivo*.

Así, parece que para que la cianamida ejerza su efecto inhibitorio sobre la actividad de la ALDH debe ser convertida enzimáticamente, mediante la acción de la catalasa, en un metabolito activo (DEMASTER Y OTROS, 1982; 1983; 1984; 1985).

En cuanto a la posible interacción entre etanol y los inhibidores de la catalasa, se ha obtenido (DEMASTER Y OTROS, 1984, 1985; CEDERBAUM Y DICKER, 1985) que cuando el etanol se administra al mismo tiempo o antes que la cianamida, el etanol protege o bloquea tanto la activación de la cianamida por la catalasa como la inhibición de la catalasa por la cianamida. Pasando, así, de obtener una oxidación del etanol por parte de la catalasa del 50% a una del 100%. Sin embargo, cuando este inhibidor se administra o solo o antes del etanol produce una reducción del 80-85% sobre la actividad de la catalasa (DEMASTER Y OTROS, 1985). Además, esta cadencia temporal entre las administraciones supone también una reducción de la inhibición *in vivo* que la cianamida ejerce sobre la ALDH (DEMASTER Y OTROS, 1985).

Este bloqueo sobre la inhibición que la cianamida ejerce sobre el enzima ALDH se ha obtenido también con azida sódica (DEMASTER Y OTROS, 1984), utilizando diferentes fuentes generadoras de peróxido como el ascorbato (DEMASTER Y OTROS, 1985) y el HPC (DEMASTER Y OTROS, 1988).

Por otra parte, las dietas ricas en cianamida provocan también una inhibición de la ALDH en los animales que son alimentados con ellas y, además, esta inhibición produce



un aumento de AcH durante la oxidación del etanol (MARCHNER Y TOTTMAR, 1976a, b; LINDROS Y OTROS, 1975).

También, se ha informado que *in vivo* (ARAGÓN Y OTROS, 1991c; SANCHIS-SEGURA, 1997), la cianamida produce una inhibición de la actividad de la catalasa cerebral.

El conjunto de estos datos indica que la cianamida produce un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ALDH, siendo además esta inhibición por parte de la cianamida dependiente de su conversión en un metabolito activo y que este proceso de bioactivación es realizado por el enzima catalasa.

En cuanto a la inhibición que la cianamida ejerce sobre la ALDH hepática y cerebral (HELLSTROM Y TOTTMAR, 1982) se han obtenido diferencias en el porcentaje de inhibición que ejerce sobre cada una de ellas (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978), siendo mayor la que ejerce sobre la ALDH hepática (DEITRICH Y OTROS, 1976; MARCHNER Y TOTTMAR, 1978), 85% y 40% de inhibición respectivamente (MARCHNER Y TOTTMAR, 1978).

En relación con la implicación de la ALDH en las conductas inducidas por etanol, a continuación se presentan datos que avalan la relación entre la actividad de la ALDH cerebral y una de las conductas más relevantes relacionadas con el etanol, el consumo voluntario.

En este sentido, la existencia de una serie de resultados paradójicos (PEACHEY Y OTROS, 1981a, b) en la interacción de cianamida o disulfirán y dosis bajas de etanol ha supuesto un punto de partida importante en el planteamiento de que la ALDH está mediando la conducta de ingesta de etanol.

En relación con esto, se ha planteado (PEACHEY Y OTROS, 1981d) que la inhibición que la cianamida produce sobre la ALDH se reduce tras la ingesta repetida de etanol ya que la respuesta que se generó tras una segunda ingesta fue menor.

Así, los resultados obtenidos indican que se produce una reducción en los niveles de AcH tras el pretratamiento con cianamida o disulfirán cuando se producen episodios de bebida repetidos sin que se observen diferencias en los niveles de etanol en sangre (PEACHEY Y OTROS, 1981a, b). Con relación al *flushing* periférico vascular se obtuvo una disminución durante las sucesivas REC y se mantuvo constante durante las RED. A partir

de esto, se podría sugerir que con ingesta repetida, las REC resultantes disminuyen progresivamente en intensidad, hecho que no se observa para las RED.

Estos resultados indicarían que existen datos contradictorios, en la acción de la cianamida en la ingesta de etanol. Otros problemas relacionados con la cianamida han sido resaltados por algunos autores (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y OTROS, 1980; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987; SPIVAK Y OTROS, 1987a, b) que indican que no sería el exceso de AcH periférico el responsable de la supresión de la ingesta de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981), las modificaciones en la actividad locomotora tras el tratamiento con etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987b) o el CAS inducido por etanol (SPIVAK Y OTROS, 1987a).

Además, como se expuso anteriormente, estos autores sugieren que la supresión de la ingesta por parte de la cianamida no dependería de la acumulación periférica de AcH, ya que esta supresión se obtuvo también cuando la acumulación periférica de AcH fue prevenida con 4-MP (LINDROS Y SINCLAIR, 1979; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SINCLAIR Y OTROS, 1980) lo que sugeriría que la cianamida afecta a las conductas inducidas por etanol por alguna acción relacionada con la inhibición directa, por parte de la cianamida, de la ALDH cerebral. Además, los resultados obtenidos en diferentes estudios sobre el consumo voluntario de alcohol en ratas (AMIR, 1978a; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SOCARANSKY Y OTROS, 1984) apoyan este punto de vista.

En este sentido, se ha obtenido que la administración de dosis bajas de 4-MP producen una inhibición parcial del metabolismo del etanol lo que podría permitir que casi todo el AcH producido por el etanol fuera metabolizado en los hepatocitos, eliminando así la acumulación de AcH en sangre (LINDROS, 1975; LINDROS Y OTROS, 1979).

Los estudios sobre ingesta voluntaria de etanol (SINCLAIR Y LINDROS, 1981), con diferentes cepas de ratas (Long Evans, AA y ANA) han mostrado que la cianamida (200 g/kg de comida) produce una supresión de la ingesta de etanol aunque la acumulación tóxica de AcH se suprima totalmente mediante la administración de 4-MP.

Sin embargo, aunque los datos sobre la actividad de la ALDH cerebral indicaron una mayor reducción para el grupo tratado solo con cianamida, tanto la actividad de la ALDH como el consumo de etanol para el grupo tratado con cianamida o cianamida y 4-MP fueron similares entre sí y diferentes de la obtenida por el grupo control.

Por otra parte, en los tres grupos se obtuvo un valor positivo y elevado para la correlación entre ingesta de etanol y actividad de la ALDH cerebral ( $r = 0.825$ ).

Los resultados obtenidos podrían indicar que la acumulación de AcH no es el factor limitante de la ingesta de alcohol y no sería el responsable de la supresión de la ingesta de alcohol obtenida tras la administración de cianamida.

Además, si el enzima catalasa, al ejercer de mediador en la bioactivación de la cianamida, es también inhibido por la cianamida, esto se podría traducir en que no se obtenga AcH central en la misma proporción que sin esa inhibición lo cual supondría que no existiera una concentración suficiente de AcH para producir los efectos psicofarmacológicos de forma que los animales no beberían alcohol.

Como se ha presentado, la elevación de los niveles en sangre de AcH no sería el factor limitante de la ingesta de etanol ya que la administración de 4-MP previene la acumulación de AcH durante el metabolismo del etanol (LINDROS, 1975; SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987). Por otra parte, la acción de la cianamida sobre la actividad de la ALDH aumenta los niveles de AcH y disminuye la ingesta de etanol. Sin embargo, con la administración de 4-MP se produce una disminución de los niveles periféricos de AcH pero esto no supone un aumento en la ingesta de etanol, por lo tanto, se podría afirmar que la cianamida produce una inhibición de la ingesta de etanol que no se debe a la acumulación de AcH periférico.

En este sentido, los resultados obtenidos en los experimentos que integran esta Tesis Doctoral son congruentes con este planteamiento a favor de una implicación de la ALDH y de la catalasa cerebrales en el metabolismo del etanol.

Así, los experimentos realizados ponen de manifiesto la inhibición que las sustancias empleadas como inhibidores en este trabajo ejercen sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Además, por otra parte, se obtiene una inducción clara de esta locomoción cuando se administra DDTC en combinación con 4-MP así como un aumento de la locomoción por parte de la combinación de cianamida y 4-MP. Estos hechos son determinantes ya que no solo proporcionarían evidencia y apoyo al metabolismo central del etanol por parte de la catalasa y de la ALDH sino que además indicaría la mediación del AcH en algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Por otra parte, los resultados obtenidos con la conducta de ingesta de etanol indican que la supresión de la ingesta por parte de la cianamida parece ser un resultado de su

acción inhibitoria directa sobre la actividad de la ALDH cerebral. Esta idea es apoyada por los resultados que indican que el consumo de alcohol tiene una correlación mayor con la actividad de la ALDH en el cerebro que con la actividad de la ALDH hepática (AMIR, 1977; 1978a, b).

Estudios posteriores (SOCARANSKY Y OTROS, 1984; SOCARANSKY Y OTROS, 1985) han estudiado también el papel de la ALDH cerebral en la ingesta voluntaria de etanol en ratas.

En uno de estos estudios (SOCARANSKY Y OTROS, 1984) se evaluaron tres cepas diferentes de ratas. Los resultados indicaron una mayor correlación entre los niveles de consumo de alcohol y la actividad de la ALDH cerebral que con la capacidad de la ALDH hepática para metabolizar aldehído. Además, se demostró que las diferencias en ALDH cerebral no son producidas por la ingesta de alcohol, sino que son características genéticas previas que pueden determinar la ingesta de etanol. Así, los resultados de este experimento confirman los obtenidos anteriormente por otros autores sugiriendo una relación directa entre la actividad de la ALDH cerebral y el consumo de etanol (AMIR, 1977; 1978; AMIR Y STERN, 1978; SINCLAIR Y LINDROS, 1979).

Por otra parte, los estudios bioquímicos (SOCARANSKY Y OTROS, 1985; SPIVAK Y AMIT, 1987) de las formas subcelulares de la ALDH cerebral indicaron una elevada correlación para las fracciones mitocondrial, de baja Km, y microsomal y la ingesta de etanol.

Además, la mediación de la ALDH cerebral en la regulación del consumo de etanol también ha sido determinada mediante episodios de bebida (*bouts*) (SPIVAK Y AMIT, 1987) en una manipulación que implicaba tanto a la cianamida como al 4-MP. Los resultados obtenidos indicaron que los animales pretratados con cianamida consumieron una cantidad mayor de etanol. Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto la implicación de la ALDH ya que el AcH estaría disminuído en el grupo pretratado con 4-MP y sin embargo se dan también aumentos en la ingesta de forma que la ALDH cerebral podría estar mediatizando el consumo de etanol mediante la regulación de los niveles centrales de AcH (SINCLAIR Y LINDROS, 1981; SPIVAK Y AMIT, 1987).

El papel de la ALDH cerebral se ha propuesto también como enzima que media la actividad locomotora (SPIVAK Y OTROS, 1987b) y el CAS (SPIVAK Y OTROS, 1987a). En el primer caso se obtuvo una disminución de la actividad locomotora en ratas en los dos grupos pretratados con cianamida y en el segundo estudio también se obtuvo una reducción de la ingesta de sacarina después del condicionamiento. En ambos casos se plantea la implicación directa de la ALDH ya que la acumulación periférica de AcH está

reducida por la acción del 4-MP y lo que sí es común a los grupos evaluados en los dos experimentos es la inhibición de la ALDH cerebral por parte de la cianamida.

Por otra parte, los datos obtenidos en el experimento del CAS indican que la acción que la cianamida ejerce sobre la actividad de la ALDH cerebral genera una potenciación de las propiedades farmacológicas de dosis bajas de etanol (0.4 g/kg), ya que a estas dosis ya se obtiene CAS. Este resultado está apoyado por los estudios realizados con sujetos humanos en los que se obtuvo que el pretratamiento con cianamida o disulfirán potenciaba la acción euforizante de bajas dosis de etanol (BROWN Y OTROS, 1983).

En este sentido, los datos obtenidos con sujetos humanos apoyan los encontrados en la investigación animal. Así, se ha obtenido (KOECHLING Y OTROS, 1995) que las personas que tienen una historia familiar de alcoholismo (FH<sup>+</sup>) presentan mayor actividad de la catalasa que los sujetos control, que no tienen una historia familiar de alcoholismo (FH<sup>-</sup>), encontrándose una relación mayor entre catalasa e ingesta de alcohol para el primer grupo (FH<sup>+</sup>) frente a la obtenida para los sujetos (FH<sup>-</sup>).

Además, en función de una serie de estudios correlacionales, realizados con ratas sin experiencia previa con el alcohol, (ARAGÓN Y OTROS, 1985b; AMIT Y ARAGÓN, 1988) en los que se han obtenido correlaciones positivas entre la actividad de la catalasa en sangre y el consumo posterior de etanol, se ha planteado la posibilidad de que actividad de la catalasa eritrocitaria sea un marcador biológico de la afinidad del organismo por ingerir alcohol.

Como se ha visto a partir de todos estos resultados, la manipulación enzimática del metabolismo del etanol mediante la alteración de los enzimas implicados en su oxidación, podría permitir afirmar no solo la existencia de un metabolismo central del etanol sino también, y más importante si cabe, determinar si es el AcH el responsable de los efectos psicofarmacológicos del etanol.

Asimismo, se ha comprobado la ausencia, por parte de las drogas empleadas (4-MP, AT, DDTC y cianamida), de efecto sobre la deambulacion espontánea de los ratones, hecho que ha permitido, por una parte, su utilización como sustancias válidas en estas interacciones ya que por sí mismas no ejercen una acción que pueda resultar contaminante para los resultados obtenidos y, por otra, mostrarían su efecto específicamente sobre la inducción que el etanol ejerce sobre la actividad locomotora.

Así, desde esta Tesis Doctoral se propone que la manipulación enzimática realizada sobre la catalasa y la ALDH así como los resultados obtenidos a partir de ella apuntan claramente hacia un metabolismo central del etanol mediado por ambas enzimas al mismo tiempo que indicaría la implicación del AcH en algunas de las acciones psicofarmacológicas del etanol.

Sin embargo, la sugerencia de que el AcH podría mediar las acciones centrales del etanol encontró dificultades debido a que los múltiples intentos de detectar o medir la presencia de AcH en el cerebro tras la exposición al etanol han presentado resultados poco claros (ERIKSSON, 1980). Sin embargo, habría que tener en cuenta que la ausencia de una demostración concluyente sobre la presencia de cantidades apreciables de AcH en el cerebro, no elimina la posibilidad de que alguna cantidad de AcH ocurra vía la oxidación periférica o central.

De este modo, la existencia de un metabolismo central del etanol está condicionada por una serie de críticas entre las que destacan, como se ya se ha expuesto, la detección de concentraciones muy bajas de AcH en el cerebro tras la ingesta de cantidades normales de etanol (ERIKSSON, 1980), la diferencia entre el metabolismo hepático y central del etanol (ECKARD Y OTROS, 1998) y la barrera enzimática cerebral al AcH formada por la ALDH (SIPPEL, 1974; ZIMATKIN, 1990; 1991), de tal forma que el cerebro estaría protegido de ese AcH formado en la periferia del organismo, en concentraciones moderadas, que pudiera escapar del hígado.

En este sentido, uno de los problemas más importantes (HUNT, 1996) para asignarle al AcH un papel en las acciones centrales del etanol ha sido que no existen drogas que actúen específicamente sobre el metabolismo del AcH provocando en este un bloqueo de su posible acción.

En función de lo anterior, este trabajo ha tratado de acercarse al metabolismo del AcH desde su formación y su degradación, para, además, determinar de este modo la localización de este proceso.

En este sentido, varios autores (LINDROS, 1978; ARAGÓN Y OTROS, 1986; SMITH Y OTROS, 1997; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997) han cuestionado la postura que defiende que es el etanol por sí mismo el responsable de los efectos psicofarmacológicos que se observan tras la administración su administración, planteando que sería con mayor probabilidad el AcH la sustancia que mediaría esas acciones.

En apoyo de esta idea, se ha informado de la existencia de propiedades reforzantes por parte del AcH. En este sentido se sabe que los animales se autoadministran AcH, mediante una respuesta operante, directamente en los ventrículos cerebrales a través de una ruta intracerebroventricular (i.c.v.), obteniendo una correlación positiva entre esa respuesta y la ingesta posterior de etanol (BROWN Y OTROS, 1978; 1979; 1980), el mismo resultado se ha obtenido con inyecciones intravenosas (MYERS Y OTROS, 1982). Así, se ha obtenido que las infusiones i.c.v. aumentan el consumo de etanol en ratas (MYERS Y VEALE, 1969) y correlaciona con la preferencia (BROWN Y OTROS, 1980) y el consumo posterior de etanol (AMIT Y SMITH, 1985), esta autoadministración se ha observado también a través de una vía periférica, como la intravenosa (AMIT Y OTROS, 1977a). También con autoinyecciones de AcH en la vena yugular se ha obtenido un aumento en el consumo posterior de alcohol en ratas (MYERS Y SINGER, 1984).

Otro de los paradigmas utilizados, para la evaluación de las propiedades reforzantes del AcH, ha sido la preferencia de lugar (*place preference*), en el que administraciones repetidas de microinfusiones i.c.v. de AcH en ratas, produjeron un condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) (SMITH Y OTROS, 1984). Posteriormente, la autoadministración en los ventrículos cerebrales de AcH sirvió para que las ratas aprendieran una respuesta operante (AMIT Y SMITH, 1985) mientras que no se obtuvieron diferencias con las respuestas obtenidas para etanol y salina.

En función de estos resultados, se podría afirmar que el AcH puede actuar como un reforzador positivo central (AMIT Y OTROS, 1977a) y estar implicado en la iniciación y mantenimiento del consumo de etanol. Por el contrario, a nivel periférico, un aumento en su concentración actuaría como un elemento preventivo en el consumo excesivo de etanol.

Desde los estudios con humanos (PEACHEY Y OTROS, 1980; AMIT Y OTROS, 1980; BROWN Y OTROS, 1983) también se han obtenido indicios de las propiedades reforzantes del AcH. Así, a partir del pretratamiento a sujetos humanos con cianamida o disulfirán junto con la ingesta posterior de pequeñas cantidades de etanol se obtuvieron una serie de informes relacionados con efectos agradables, así como un aumento de la euforia y el humor inducidos por etanol (BROWN Y OTROS, 1983), estos resultados son más probables en el grupo pretratado con Temposil® (AMIT Y OTROS, 1980).

La idea del AcH como sustancia psicoactiva se ha visto reforzada con los resultados de los experimentos realizados en conductas como actividad locomotora (ARAGÓN Y OTROS,

1991a; ESCARABAJAL Y OTROS, 1999), narcosis y letalidad (ARAGÓN Y AMIT, 1987; TAMPIER Y OTROS, 1988; ARAGÓN Y OTROS, 1991b) y CAS (BROWN Y OTROS, 1978; ARAGÓN Y OTROS, 1985a, 1986) entre otras.

También, los experimentos realizados con cepas de ratones normales y acatalasémicos (ARAGÓN Y OTROS, 1992b) arrojan resultados en este sentido, ya que se obtiene una mayor actividad locomotora, en todas las dosis de etanol utilizadas, en los ratones normales frente a los acatalasémicos.

De nuevo, los datos sugieren que los efectos reforzantes atribuidos al etanol pueden estar mediados por su metabolito, el AcH.

Además, como ya se expuso en la introducción teórica hay, por una parte, numerosas pruebas (McKENNA Y OTROS, 1976; GAUNT Y DE DUVE, 1976; ARNOLD Y HOLTZMAN, 1978; BRANNAN Y OTROS, 1981; KOIVULA Y OTROS, 1981; INOUE Y LINDROS, 1982; ASPBERG Y TOTTMAR, 1994; ZIMATKIN Y OTROS, 1992; ASPBERG Y OTROS, 1993; ZIMATKIN Y LINDROS, 1996; HAMBY-MASON Y OTROS, 1997) de la existencia a nivel central de los sistemas enzimáticos necesarios para el metabolismo del etanol en el cerebro y, por otra, de la importancia del AcH en algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol (LINDROS, 1978; ARAGÓN Y OTROS, 1986; SMITH Y OTROS, 1997; ZIMATKIN Y DEITRICH, 1997).

A modo de conclusión, los resultados encontrados, en otras investigaciones así como los obtenidos en los diferentes experimentos que forman parte de esta Tesis Doctoral, apoyarían la idea de una oxidación central del etanol vía la actividad peroxidativa de la catalasa junto con la acción del isozima ALDH<sub>2</sub> mitocondrial de baja Km y, podrían, indirectamente, dar apoyo a la implicación de la formación central de AcH en la mediación de los efectos psicofarmacológicos y reforzadores del etanol.

A continuación se presenta un apartado integrado por una serie de conclusiones globales que se pueden extraer de este trabajo.



## II. CONCLUSIONES GLOBALES.

Aunque a lo largo de la discusión general se han ido comentando y analizando las conclusiones de este trabajo, en este apartado se realiza una síntesis con el objetivo de facilitar y proporcionar una visión global de las mismas. Las conclusiones serían las siguientes:

1- La administración de las sustancias empleadas en los estudios que componen esta Tesis Doctoral, como AT, 4-MP, DDTC y cianamida, a las dosis utilizadas, no tiene ningún efecto sobre la deambulación espontánea de los ratones en un campo abierto.

2- La administración de AT produce una reducción o bloqueo de la actividad locomotora inducida por etanol que es dependiente de la dosis de AT.

3- Por otra parte, el AT produce una inhibición de la actividad de la catalasa cerebral que también es dependiente de la dosis de inhibidor administrada.

4- Además, se obtiene una correlación elevada y positiva entre los dos efectos comentados anteriormente.

5- Por otro lado, la administración de DDTC o cianamida, produce una reducción o bloqueo en la actividad locomotora inducida por etanol que es dependiente de la dosis de inhibidor administrada.

6- La administración combinada de 4-MP y DDTC supone un aumento estadísticamente significativo de la actividad locomotora inducida por el etanol en ratones.

7- La administración conjunta de 4-MP y cianamida anula el efecto inhibitorio que la cianamida ejerce sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

8- Las diferencias encontradas en el patrón de conducta que se obtiene tras la administración de 4-MP junto los mencionados inhibidores –DDTC y cianamida– podría deberse a la acción inhibitoria diferencial que ejercen estas sustancias. Así, mientras que el DDTC inhibe solo la actividad del enzima ALDH la cianamida ejerce su efecto inhibitorio tanto sobre la actividad de la ALDH como sobre la actividad del enzima catalasa.

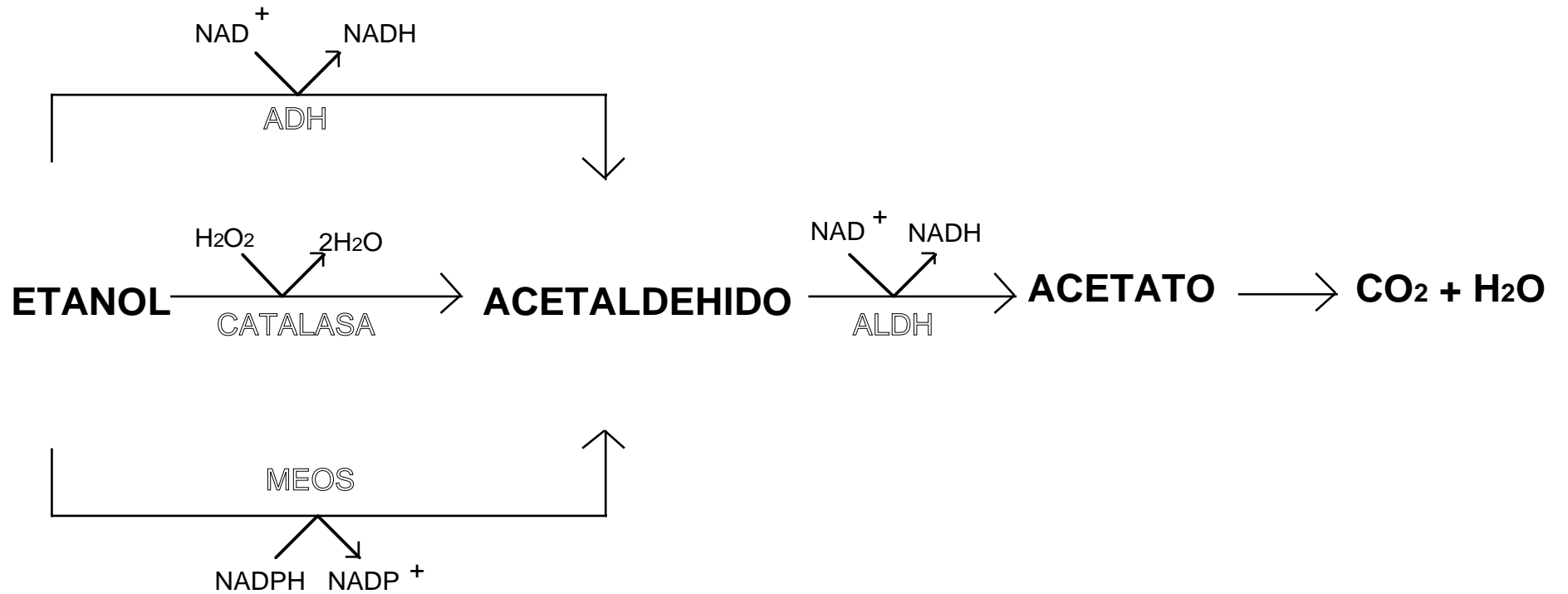
9- La inocuidad de estas sustancias podría indicar que dado que no afectan a la actividad locomotora espontánea la acción que se observa tras su administración se estaría produciendo sobre circuitos implicados en la mediación de las conductas inducidas por etanol.

10- Todas estas sustancias podrían ejercer estos efectos a través de su acción en los sistemas enzimáticos catalasa y ALDH cerebrales.

11- La implicación de los enzimas encargados tanto de la formación como de la degradación del AcH en las conductas inducidas por el etanol daría de forma indirecta, apoyo a la idea de una mediación del AcH en algunas de las acciones psicofarmacológicas inducidas por el etanol, en este caso, la actividad locomotora.

## **APÉNDICE: ESQUEMAS Y FIGURAS**

METABOLISMO DEL ETANOL



### 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL (AT)<sup>1</sup>

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)



---

<sup>1</sup> La inhibición de la actividad enzimática se ha representado mediante la presentación del enzima con el nombre tachado. Se ha seguido este mismo criterio en los sucesivos esquemas.



### 4-METILPIRAZOL (4-MP)

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)



### ÁCIDO DIETILDITHIOCARBAMATO (DDTC)

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)





**ÁCIDO DIETILDITHIOCARBAMATO (DDTC) + 4-METILPIRAZOL (4-MP)**

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)



## CIANAMIDA

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)



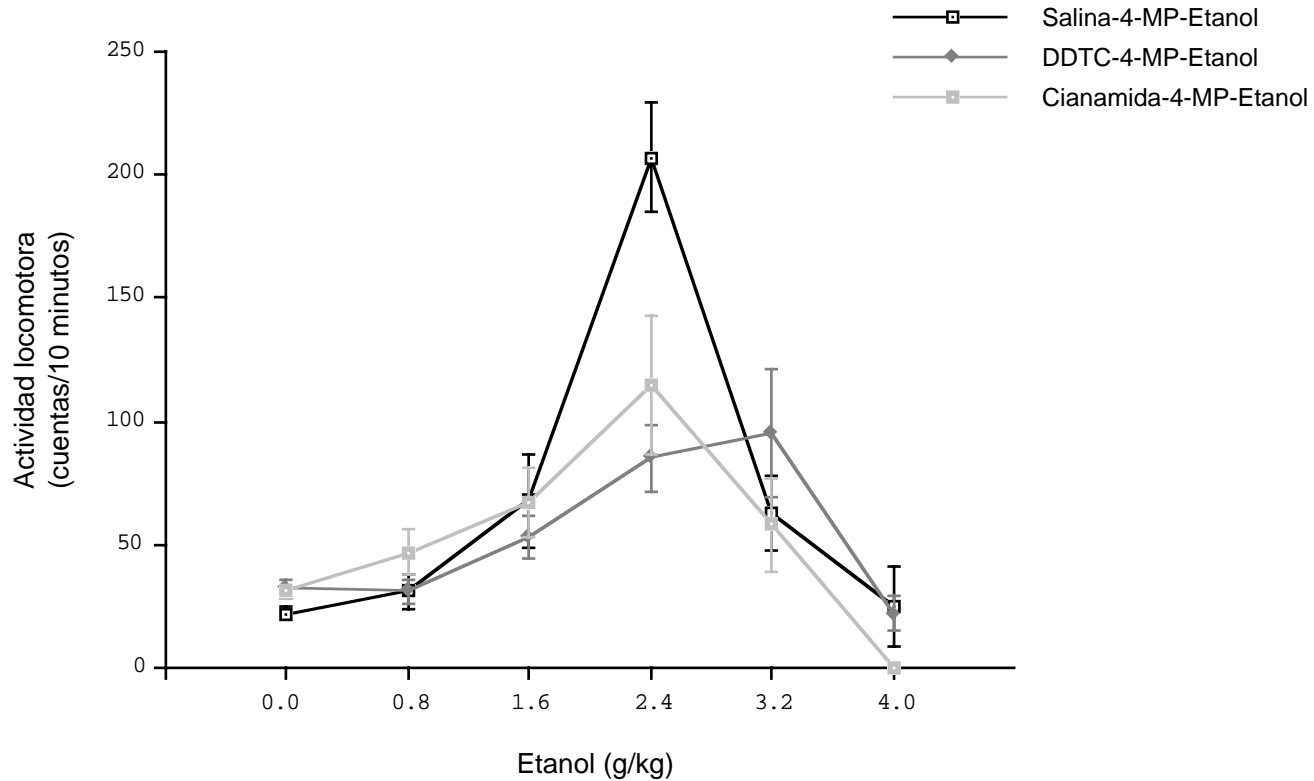
**CIANAMIDA + 4-METILPIRAZOL (4-MP)**

Nivel periférico (Hígado)



Nivel central (Cerebro)





**Fig. 15:** Efecto del tratamiento combinado con DDTC o cianamida y 4-MP sobre la actividad locomotora inducida por etanol. Los ratones fueron pretratados i.p. con DDTC (0, 114, 228, 456 mg/kg), cianamida (0, 12.5, 25, 50 mg/kg) o salina, ocho horas o dos horas antes del tratamiento con etanol (0, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2, 4 g/kg).

Los datos representan las medias y los errores estándar.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adinolfi, A.; Adinolfi, M. y Hopkinson, D. A. (1984). Immunological properties of human alcohol dehydrogenase (ADH) isozymes. *Journal of Immunogenetics*. 5: 283-296.
- Aebi, H. (1984). Catalase. En H. U. Bergmeyer (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. Vol 3. 273-286.
- Agarwal, D. P. (1997). Molecular genetic aspects of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacopsychiatry*. 30:3. 79-84.
- Agarwal, D. P.; Dethling, J.; Wolken, S.; Harada, S. y Goedde, H. W. (1982b). Subcellular distribution and properties of ALDH isozymes in autopsy livers from normals and alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 432.
- Agarwal, D. P.; Eckey, R.; Harada, S. y Goedde, H. W. (1984). Basis of aldehyde dehydrogenase deficiency in Orientals: immunochemical studies. *Alcohol*. 1: 2. 111-118.
- Agarwal, D. P y Goedde, H. W. (1987). Genetic variation in alcohol metabolizing enzymes: Implications in alcohol use and abuse. *Genetics and Alcoholism*. 121-139.
- Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1992). Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetics*. 2: 2. 48-62.
- Agarwal, D. P.; Harada, S. y Goedde, H. W. (1981a). A search for the Indianapolis-variant of human alcohol dehydrogenase in liver autopsy samples from North Germany and Japan. *Human Genetics*. 59: 170-171.
- Agarwal, D. P.; Harada, S. y Goedde, H. W. (1981b). Racial differences in biological sensitivity to ethanol: The role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 5: 1. 12-16.
- Agarwal, R. P.; McPherson, R. A. y Phillips, M. (1983). Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 42: 293-310.
- Agarwal D. P.; Tobar-Rojas, L.; Meier-Tackman, D.; Harada, S.; Schrappe, O.; Kaschkat, G. y Goedde, H. W. (1982a). Erythrocyte aldehyde dehydrogenase: A biochemical marker of alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 432.
- Alexander, N.M. (1959). Antithyroid action of 3-amino-1,2,4-triazole. *Journal of Biological Chemistry*. 234: 148-150.
- Amir, S. (1977). Brain and liver aldehyde dehydrogenase: relations to ethanol consumption in wistar rats. *Neuropharmacology*. 16: 781-784.
- Amir, S. (1978a). Brain and liver aldehyde dehydrogenase activity and voluntary ethanol consumption by rats: Relations to strain, sex and age. *Psychopharmacology*. 57: 97-102.
- Amir, S. (1978b). Brain aldehyde dehydrogenase: Adaptative increase following prolonged ethanol administration in rats. *Neuropharmacology*. 17: 463-467.

- Amir, S. y Stern, M. H. (1978). Electrical stimulation and lesions of the medial forebrain bundle of the rat: changes in voluntary ethanol consumption and brain aldehyde dehydrogenase activity. *Psychopharmacology*. 57: 167-174.
- Amit, Z. y Aragón, C. M. G. (1988). Catalase activity measured in rats naive to ethanol correlates with later voluntary ethanol consumption: possible evidence for a biological marker system of ethanol intake. *Psychopharmacology*. 95: 512-515.
- Amit, Z.; Brown, Z. W.; Amir, S.; Smith, B. y Sutherland, E. A. (1980). Behavioral assessment of the role of acetaldehyde in the mediation of alcohol intake in animals and humans. En K. Eriksson, J. D. Sinclair, y K. Kiianmaa, (eds). *Animal Models in Alcohol Research*. New York. Academic Press. 159-165.
- Amit, Z.; Brown, Z. y Rockman, G. E. (1977a). Possible involvement of acetaldehyde, norepinephrine and their tetrahydroisoquinoline derivatives in the regulation of ethanol self-administration. *Drug and Alcohol Dependence*. 2: 495-500.
- Amit, Z.; Levitan, D. E.; Brown, Z. W. y Rogan, F. (1977b). Possible involvement of central factors in the mediation of conditioned taste aversion. *Neuropharmacology*. 16: 121-124.
- Amit, Z.; Levitan, D. E. y Lindros, K. O. (1976). Suppression of ethanol intake following administration of dopamine-beta-hydroxylase inhibitors in rats. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*. 223: 114-119.
- Amit, Z. y Smith, B. R. A. (1985). A multi-dimensional examination of the positive reinforcing properties of acetaldehyde. *Alcohol*. 2. 367-370.
- Amit, Z. y Smith, B. R. A. (1989). The role of acetaldehyde in alcohol addiction. En K. E. Crow y R. D. Batt (eds.). *Human metabolism of alcohol*. Vol. 2. Regulation, enzymology and metabolites of ethanol. Florida. CRC Press Inc. Cap. 14. 192-200.
- Amit, Z. y Stern, M. H. (1971). A further investigation of alcohol preference in the laboratory rat induced by hypothalamic stimulation. *Psychopharmacology*. 21: 317-327.
- Amit, Z. y Sutherland, E. A. (1975). The relevance of recent animal studies for the development of treatment procedures for alcoholics. *Drug and Alcohol Dependence*. 1: 1. 3-13.
- Anandatheerthavarada, H. K.; Shankar, S. K.; Bhamre, S.; Boyd, M. R.; Song, B. J. y Ravindranath, V. (1993). Induction of brain cytochrome P450 IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Research*. 601: 279-285.
- Anderson, R. J.; Sponsel, H. T.; Brown, S. E. S.; Breckon, R.; Ray, C.; Simon, F. R. y Guzelian, P. S. (1997). Mechanisms of alcohol impairment of recovery from mechanically denuded areas made within cultured rat hepatocytes. *Hepatology*. 25: 1. 128-132.
- Aragón, C. M. G.; Abitbol, M. y Amit, A. (1986). Acetaldehyde may mediate reinforcement and aversion produced by ethanol. An examination using a conditioned taste-aversion paradigm. *Neuropharmacology*. 25: 1. 79-83.

- Aragón, C. M. G.; Abitbol, M. y Amit, Z. (1991d). Ethanol-induced CTA mediated by acetaldehyde through central catecholamine activity. *Psychopharmacology*. 103: 74-77.
- Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1985). A two dimensional model of alcohol consumption: Possible interaction of brain catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol*. 2: 357-360.
- Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1987). Genetic variation in ethanol sensitivity in C57BL/6 and DBA/2 mice: a further investigation of the differences in brain catalase activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 492: 398-400.
- Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1992). The effects of 3-amino-1,2,4-triazole on voluntary ethanol consumption: evidence for brain catalase involvement in the mechanism of action. *Neuropharmacology*. 31: 7. 709-712.
- Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1993). Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 44: 547-554.
- Aragón, C. M. G.; Pesold, C. N. y Amit, Z. (1992b). Ethanol-induced motor activity in normal and acatalasemic mice. *Alcohol*. 9: 207-211.
- Aragón, C. M. G.; Rogan, F. y Amit, Z. (1991a). Dose-and time-dependent effect of an acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. *Biochemical Pharmacology*. 42: 3. 699-702.
- Aragón, C. M. G.; Rogan, F. y Amit, Z. (1992a). Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Biochemical Pharmacology*. 44: 93-98.
- Aragón, C. M. G.; Spivak, K. y 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 Sciences*. 37: 22. 2077-2084.
- Aragón, C. M. G.; Spivak, K. y 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. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 13: 1. 104-108.
- Aragón, C. M. G.; Spivak, K. y Amit, Z. (1991b). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on ethanol-induced narcosis, lethality and hypothermia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 39: 55-59.
- Aragón, C. M. G.; Spivak, K.; Smith, B. R. y Amit, Z. (1993). Cyanamide on ethanol intake: How does it really work?. *Alcohol and Alcoholism*. 28: 413-421.
- Aragón, C. M. G.; Sternklar, G. y Amit, Z. (1985b). A correlation between voluntary ethanol consumption and brain catalase activity in the rat. *Alcohol*. 2: 353-356.
- Aragón, C. m. G.; Stotland, L. M. y Amit, Z. (1991c). Studies on ethanol-brain catalase interaction: Evidence for central ethanol oxidation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 15: 2. 165-169.
- Armstrong, J. D. (1957). The protective drugs in the treatment of alcoholism. *Canadian Medical Assessment Journal*. 77: 228-232.



- Armstrong, J. D. y Kerr, H. T. (1956). A new drug for alcoholism treatment. II. A new protective drug in the treatment of alcoholism; preliminary clinical trials of citrated calcium carbimide. *Canadian Medical Assessment Journal*. 74: 795-797.
- Arnold, G. Y Holtzman, E. (1978). Microperoxisomes in the central nervous system of the postnatal rat. *Brain Research*. 155: 1-17.
- Asai, H.; Imaoka, S.; Kuroki, T.; Monna, T. y Funae, Y. (1996). Microsomal ethanol oxidizing system activity by hepatic cytochrome P450s. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 277: 1004-1009.
- Aspberg, A. y Tottmar, O. (1992). Development of antioxidant enzymes in rat brain and in reaggregation culture fetal rat brain cells. *Developmental Brain Research*. 66: 55-58.
- Aspberg, A. y Tottmar, O. (1994). Ethanol-induced increase in catalase activity in reaggregation cultures of rat brain cells is due to increased oligodendrocyte differentiation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 18: 3. 620-624.
- Aspberg, A.; Soderback, M. y Tottmar, O. (1993). Increase in catalase activity in developing rat brain cell reaggregation culture in the presence of ethanol. *Biochemical Pharmacology*. 46: 1873-1876.
- Aspila, K.; Sastri, V. S. y Chakrabarti, C. L. (1969). Studies on the stability of dithiocarbamic acids. *Talanta*. 16: 1099-1102.
- Behar, D. ; Berg, C. J.; Rapoport, J. L.; Nelson, W.; Linnoila, M.; Cohen, M.; Bozevich, C. y Marshall, T. (1983). Behavioral and physiological effects of ethanol in high-risk and control children: a pilot study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 7: 4. 404-410.
- Beisswender, T. V.; Holmquist, B. y Vallee, B. L. (1985). CADH is the sole alcohol dehydrogenase isozyme of mammalian brains: implications and inferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 82: 8369-8373.
- Berger, D.; Berger, M. y Von Wartburg, J. P. (1974). Structural studies of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *European Journal of Biochemistry*. 50: 215-225.
- Berger, D. y Weiner, H. (1977). Effect of disulfiram and chloral hydrate on the metabolism of catecholamines in rat liver and brain. *Biochemical Pharmacology*. 26: 741-747.
- Beynen, A.C.; Buechler, K.F.; Van Der Molen, A.J. y Geelen, M.J.H. (1981). Inhibition of lipogenesis in isolated hepatocytes by 3-amino-1,2,4-triazole. *Toxicology*. 22: 171-178.
- Bhagwat, S. V.; Boyd, M. R. y Ravindranath, V. (1995). Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 320: 73-83.
- Blomstrand, R. (1971). Studies on the inhibitory effect on ethanol oxidation in man after administration of 4-methylpyrazole. En G. A. Martini y Ch. Bode (eds). *Metabolic changes induced by alcohol*. Springer Verlag. 38-52.

- Blomstrand, R. y Theorell, H. (1970). Inhibitory effect on ethanol oxidation in man after administration of 4-methylpyrazole. *Life Sciences*. 9: 631-640.
- Bosron, W. F.; Ehrig, T. y Li, T. K. (1993). Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. *Seminars in Liver Disease*. 13: 126-135.
- Bosron, W. F.; Li, T. K.; Dafaldecke, W. P. y Vallee, B. L. (1979). Human liver  $\pi$ -alcohol dehydrogenase: kinetic and molecular properties. *Biochemistry*. 18: 1101-1105.
- Bosron, W. F.; Li, T. K. y Vallee, B. L. (1980). New molecular forms of human liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of ADH<sub>Indianapolis</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 77: 5784-5788.
- Bosron, W. F.; Magnes, L. J. y Li, T. K. (1983). Human liver alcohol dehydrogenase: ADH<sub>Indianapolis</sub> results from the genetic polymorphism at the ADH<sub>2</sub> gene locus. *Biochemical Genetics*. 21: 735-744.
- 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 Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brannan, T. S.; Maker, H. S. y Raes, I. P. (1981). Regional distribution of catalase in the adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 16: 1. 307-309.
- Braun, T.; Grzeschik, K. H.; Bober, E.; Singh, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1986). The structural gene for the mitochondrial aldehyde dehydrogenase maps to human chromosome 12. *Human Genetics*. 73: 365-367.
- Brewer, C. (1993). Recent developments in disulfiram treatment. *Alcohol and Alcoholism*. 28: 383-395.
- Brien, J. F.; Andrews, P.J.; Loomis, C. W. y Page, J. A. (1983). Gas-liquid chromatographic determination of salsonisol in the striatum of rat brain during the calcium carbimide-ethanol interaction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61: 6. 632-640.
- Brien, J. F. y Loomis, C. W. (1983). Pharmacology of acetaldehyde. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61: 1. 1-22.
- Brien, J. F. y Loomis, C. W. (1985). Aldehyde dehydrogenase inhibitors as alcohol-sensitizing drugs: a pharmacological perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 6: 12. 477-480.
- Brien, J. F.; Peachey, J. E. y Loomis, C. W. (1980a). Intraindividual variability in the calcium carbimide-ethanol interaction. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 18: 199-205.
- Brien, J. F.; Peachey, J. E. y Loomis, C. W. (1980b). Calcium carbimide-ethanol interaction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 27: 426-433.
- Brien, J. F.; Peachey, J. E.; Loomis, C. W. y Rogers, B. J. (1979). The calcium carbimide-ethanol interaction: effects of ethanol dose. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 25: 454-463.
- Brien, J. F.; Peachey, J. E.; Rogers, B. J. y Loomis, C. W. (1978). A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 14: 133-141.

- Brien, J. F.; Tam, G. S.; Cameron, R. J.; Steenaart, N. A. E. y Loomis, C. W. (1985). A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrazelethiol, calcium carbimide, and disulfiram. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 63: 438-443.
- Browman, K. E. y Crabbe, J. C. (1999). Alcohol and genetics: New animal models. *Molecular Medicine Today*. 5: 310-318.
- Brown, Z.; Amit, Z. y Rockman, G. E. (1979). Intraventricular self-administration of acetaldehyde but not ethanol in naive laboratory rats. *Psychopharmacology*. 64: 271-276.
- Brown, Z. W.; Amit, Z. y Smith, B. R. (1980). Intraventricular self-administration of acetaldehyde and voluntary consumption of ethanol in rats. *Behavioral Neural Biology*. 28: 150-155.
- Brown, Z. W.; Amit, Z.; Smith, B. y Rockman, G. E. (1978). Differential effects on conditioned taste aversion learning with peripherally and centrally administered acetaldehyde. *Neuropharmacology*. 17: 931-935.
- Brown, Z. W.; Amit, Z.; Smith, B. R.; Sutherland, E. A. y Selvaggi, N. (1983). Alcohol-induced euphoria enhanced by disulfiram and calcium carbimide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 7: 276-278.
- Budavari, S.; O'Neil, M.J.; Smith, A. y Heckelman, P.E. (1989). "The Merck Index". Merck and Co., Inc. USA. Eleventh edition.
- Buening, M. K. y Wold, J. S. (1982). Ethanol-moxalactam interactions in vivo. *Review of Infection and Disease*. 4. Suppl. 555-563.
- Bühler, R.; Hempel, J.; Von Wartburg, J. P. y Jörnvall, J. (1984). Human liver alcohol dehydrogenase: the unique properties of the "atypical" isoenzyme B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Bern can be explained by a single base mutation. *Alcohol*. 2: 47-51.
- Bühler, R.; Pestalozzi, D.; Hess, M. y Von Wartburg, J. P. (1983). Immunohistochemical localization of alcohol dehydrogenase in human kidney, endocrine organs and brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 18: 1. 55-59.
- Burnett, K. G. y Felder, M. R. (1978a). Genetic regulation of liver alcohol dehydrogenase in *Peromyscus*. *Biochemical Genetics*. 16: 5-6. 443-54.
- Burnett, K. G. y Felder, M. R. (1978b). *Peromyscus* alcohol dehydrogenase: lack of cross-reacting material in enzyme-negative animals. *Biochemical Genetics*. 16: 11-12. 1093-105.
- Cao, Q. N.; Tu, G. C. y Weiner, H. (1988). Mitochondria as the primary site of acetaldehyde metabolism in beef and pig liver slices. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 12: 720-724.
- Carmichael, F. J.; Israel, I.; Saldivia, V.; Giles, H. G.; Meggiorini, S. y Orrego, H. (1987). Blood acetaldehyde and the ethanol - induced increase in splanchnic circulation. *Biochemical Pharmacology*. 36: 16. 2673-2678.

- Carr, G.; Brown, Z. W.; Rockman, G. E. y Amit, Z. (1980). Reduction in voluntary ethanol consumption by treatment with alcohol dehydrogenase inhibitors. *Substance and Alcohol Actions/Misuse*. 1: 187-196.
- Casier, H. y Merlevede, E. (1962). On the mechanism of the disulfiram-ethanol intoxication symptoms. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Thérapie*. 139: 165-176.
- Casier, H. y Polet, H. (1959). The metabolism of ethyl alcohol and acetaldehyde labelled with C<sup>14</sup>. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Thérapie*. 120: 498.
- Cederbaum, A. I. (1981). The effect of cyanamide on acetaldehyde oxidation by isolated rat liver mitochondria and on the inhibition of pyruvate oxidation by acetaldehyde. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 5: 1. 38-44.
- Cederbaum, A. I. y Dicker, E. (1981). The effect of cyanamide on the metabolism of ethanol and acetaldehyde and on gluconeogenesis by isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 30: 3079-3088.
- Cederbaum, A. I. y Dicker, E. (1985). Inhibition of the peroxidatic activity of catalase toward alcohols by the aldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide. *Toxicology Letters*. 29: 107-114.
- Chernikevich, I. P.; Lomeko, I. E.; Voskoboyev, A. I. y Ostrovsky, Y. M. (1984). Evidence on the presence of alcohol dehydrogenase in rat and bovine brain. *Neurokhimia*. 3: 130-138.
- Chevens, L. C. F. (1953). Antabuse addiction. *British Medical Journal*. 1: 1450-1451.
- Chick, J. y Erickson, C. K. (1996). Consensus conference on alcohol dependence and the role of pharmacotherapy in its treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 20: 2. 391-402.
- Clarke, D. W.; Steenaart, N. A. E.; Slack, C. J. y Brien, J. F. (1986). Pharmacokinetics of ethanol and its metabolite, acetaldehyde, and fetotolethality in the third-trimester pregnant guinea pig for oral administration of acute, multiple-dose ethanol. *Canadian Journal of Pharmacology*. 64: 1060-1067.
- Clemente, I. C. y Sánchez-Turet, M. (1999). Genética del alcoholismo: Asociación con marcadores biológicos. En M. Sánchez-Turet (ed). *Enfermedades y problemas relacionados con el alcohol*. Barcelona. Espaxs. 39-51.
- Cobby, J.; Mayersohn, M. y Selliah, S. (1977a). The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *Journal Pharmacology and Experimental Therapy*. 202: 724-731.
- Cobby, J.; Mayersohn, M. y Selliah, S. (1977b). Methylthioethyldithiocarbamate, a metabolite of disulfiram in man. *Life Sciences*. 21: 937-942.
- Cohen, G. (1976). Alkaloid products in the metabolism of alcohol and biogenic amines. *Biochemical Pharmacology*. 25: 1123-1128.
- Cohen, G.; Sinet, P. M. y Heikkila, R. E. (1980). Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 4: 4. 366-370.

- Cohen, G.; Sinet, P. M. y Heikkila, R. E. (1983). Ethanol oxidation by catalase in rat brain in vivo. *Research Monograph*. 9: 311-315.
- Collier, H. O. (1972). Drug dependence: a pharmacological analysis. *British Journal of Addiction to Alcohol and Other Drugs*. 67: 4. 277-286.
- Collins, A.; Cashaw, J. L. y Davis, V. E. (1973). Dopamine-derived tetrahydroisoquinoline alkaloids. Inhibitors of neuroamine metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 22: 2337-2348.
- Collins, J. M. y Brown, L. M. (1960). Calcium carbimide—A new protective drug in alcoholism. *The Medical Journal of Australia*. 835-838.
- Coon, M. J. y Koop, D. R. (1987). Alcohol-inducible cytochrome P-450. *Archives of Toxicology*. 60: 16-21.
- Couzigou, P.; Coutelle, C.; Fleury, B. y Iron, A. (1994). Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, alcoholism and alcohol related disease. *Alcohol and Alcoholism. Suppl. INC*. 2: 21-27.
- Crabb, D. W.; Bosron, W. F. y Li, T. K. (1983). Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: Application to predicting alcohol elimination rates in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 224: 299-309.
- Crabb, D. W.; Edenberg, H. J.; Bosron, W. F. y Li, T. K. (1989). Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. *Journal of Clinical Investigation*. 88: 314-316.
- Critcher, E. C. y Myers, R. D. (1987). Cyanamide given ICV or systemically to the rat alters subsequent alcohol drinking. *Alcohol*. 4: 347-353.
- Critcher, E. C.; Hepler, J. R. y Myers, R. D. (1983a). Induction of alcohol preference in the rat after aldehyde elevation in brain by ICV infusion of cyanamide. *Alcoholism*. 7: 346.
- Critcher, E. C.; Hepler, J. R. y Myers, R. D. (1983b). Increase in voluntary alcohol drinking after elevation of endogenous aldehyde by cyanamide. *Neuroscience Abstracts*. 9: 1241.
- Cross, A. y Jones, O. T. G. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1057: 281-298.
- Cruz-Coke, R. (1973). The alcohol phenotype and genetic theory. *Lancet*. 2: 1272.
- Cruz-Coke, R. (1979). Heterogeneidad genética de la dependencia al alcohol. *Revista Médica de Chile*. 107: 534-539.
- Cruz-Coke, R. (1983). Genetics and alcoholism. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 5: 179-180.
- Davis, E. V. y Walsh, M. J. (1970). Alcohol, amines, and alkaloids: A possible basis for alcohol addiction. *Science*. 167: 1005-1007.
- De Saint-Blanquat, G. y Derache, R. (1976). Mecanisme d'action des substances anti-alcool dependantes (Disulfirame). *Journal of Pharmacology*. 7: 393-408.
- Deitrich, R. A. (1966). Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochemical Pharmacology*. 15: 1911-1922.

- Deitrich, R. A. (1976). Biochemical aspects of alcoholism. *Psychoneuroendocrinology*. 1: 325-346.
- Deitrich, R. A.; Collins, A. C. y Erwin, V. G. (1972). Genetic influence upon phenobarbital-induced increase in rat liver supernatant aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 247: 7232-7236.
- Deitrich, R. A. y Erwin, V. G. (1971). Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in vivo by disulfiram and diethylthiocarbamate. *Molecular Pharmacology*. 7: 301-307.
- Deitrich, R. A.; Troxell, P. A.; Worth, W. S. y Erwin, V. G. (1976). Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochemical Pharmacology*. 25: 2733-2737.
- DeMaster, E. G.; Kaplan, E. y Chester, E. (1981). The differential response of tissue catalase activity to chronic alcohol administration in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 5: 1. 45-48.
- DeMaster, E. G.; Kaplan, E.; Nagasawa, H. T. y Shirota, F. (1982). Metabolic activation of cyanamide by liver mitochondria, a requirement for the inhibition of aldehyde dehydrogenase enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 107: 4. 1333-1339.
- DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. y Shirota, F. (1983). Metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vitro. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: 1. 273-277.
- DeMaster, E. G.; Redfern, B.; Shirota, F. N. y Nagasawa, H. T. (1986). Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochemical Pharmacology*. 35: 13. 2081-2085.
- DeMaster, E. G.; Shirota, F. N. y Nagasawa, H. T. (1984). The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 122: 1. 358-365.
- DeMaster, E. G.; Shirota, F. N. y Nagasawa, H. T. (1985). Catalase mediated conversion of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol*. 2: 117-121.
- DeMaster, E. G.; Shirota, F. N. y Nagasawa, H. T. (1988). Oxidation of cyanamide by a cumene hydroperoxide-supported catalase reaction yields disulfiram cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Archives*. 4: 203-207.
- DeMaster, E. G. y Stevens, J. M. (1988). Acute effects of the aldehyde dehydrogenase inhibitors, disulfiram, pargiline and cyanamide, on circulating ketone body levels in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 37: 2. 229-234.
- DeMaster, E. G.; Stevens, J. M. y Redfern, B. (1988). Ethanol oxidation by cumene hydroperoxide- and hydrogen peroxide-supported peroxidatic activities of catalase. *Biochemical Archives*. 4: 319-327.
- Dembiec, D.; MacNamee, D. y Cohen, G. (1976). The effect of pargyline and other monoamine oxidase inhibitors on blood acetaldehyde levels in ethanol-intoxicated mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 197: 332-339.

- Djuric, D.; Postic-Grujin, A.; Graovac-Leposavic, L. y Delic, V. (1973). Disulfiram as an indicator of human susceptibility to carbon disulfide. *Archives of Environmental Health*. 26: 287-289.
- Duester, G. (1991). A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 15: 568-572.
- Duester, G. (1994). Retinoids and the alcohol dehydrogenase gene family. *EXS*. 71: 279-90.
- Duncan, R. J. S.; Kline, J. E. y Sokoloff, L. (1976). Identity of brain alcohol dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 153: 561-566.
- Duncan, R. J. S.; Sourkes, T. L.; Dubrovsky, B. O. y Quik, M. (1975). Activity of aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase and acetylcholine esterase in striatum of cats bearing electrolytic lesions in the medial forebrain bundle. *Journal of Neurochemistry*. 24: 143-147.
- Duncan, R. J. S. y Tipton, K. F. (1971). The kinetics of pig brain aldehyde dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*. 22: 4. 538-43.
- Eckardt, M. J.; File, S. E.; Gessa, G. L.; Grant, K. A.; Guerri, C.; Hoffman, P. L.; Kalant, H.; Koob, G. F.; Li, T-K. y Tabakoff, B. (1998). Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 22: 5. 998-1040.
- Eckey, R.; Agarwal, D. P.; Saha, N. y Goedde, H. W. (1986). Detection and partial characterization of a variant form of cytosolic aldehyde dehydrogenase isozyme. *Human Genetics*. 72: 95-97.
- Edwards, J. A. y Evans, P. D. A. (1967). Ethanol metabolism in subjects possessing typical and atypical liver alcohol dehydrogenase. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 8: 824-829.
- Ehrig, T.; Bosron, W. F. y Li, T. K. (1990). Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol Alcohol Supplement*. INC. 25: 2-3. 105-116.
- Eide, I.; Syversen, T. L. M. (1982). Uptake of elemental mercury and activity of catalase in rat, hamster, guinea-pig, normal and acatalasemic mice. *Acta Pharmacologie et Toxicologie*. 52: 371-376.
- Eneanya, D. I.; Bianchine, J. R.; Duran, D. O. y Andresen, B. D. (1981). The actions and metabolic fate of disulfiram. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*. 21: 575-596.
- Eriksson, C. J. P. (1973). Ethanol and acetaldehyde metabolism in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochemical Pharmacology*. 22: 2283-2292.
- Eriksson, C. J. P. (1977). The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-II. Regulation of the hepatic acetaldehyde level. *Biochemical Pharmacology*. 26: 249-252.
- Eriksson, C. J. P. (1980). Problems and pitfalls in acetaldehyde determinations. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 4: 22-29.
- Eriksson, C. J. P. y Deitrich, R. A. (1980). Evidence against a biphasic effect of acetaldehyde on voluntary ethanol consumption in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 13: Suppl. 1. 291-296.

- Eriksson, C. J. P. y Fukunaga, T. (1993). Human blood acetaldehyde. *Alcohol and Alcoholism. Suppl.* 2: 9-25.
- Eriksson, C. J. P. y Sippel, H. W. (1977). The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation-I. The distribution acetaldehyde in liver, brain, blood and breath. *Biochemical Pharmacology.* 26: 241-247.
- Erwin, V. G. y Deitrich, R. A. (1966). Brain aldehyde dehydrogenase localization purification and properties. *Journal of Biological Chemistry.* 241: 3533-3539.
- Erwin, V. G. y Deitrich, R. A. (1972). Heterogeneity of alcohol dehydrogenase enzymes in various tissues. *Biochemical Pharmacology.* 21: 2915-2924.
- Erzielev, G. I. (1973). Acetaldehyde and alcoholism. Pharmacogenesis of a disulfiram-alcohol reaction and its management by binding acetaldehyde with sodium metabisulfite. *Soviet Neurology and Psychiatry.* 6: 42-51.
- Escarabajal, M. D.; Miquel, M. y Aragón, C. M. G. (1999). A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol's induced locomotor activity in mice. *Journal of Studies on Alcohol.* (en prensa).
- Ewing, J. A.; Rouse, B. A. y Pellizzari, E. D. (1974). Alcohol sensitivity and ethnic background. *American Journal of Psychology.* 131: 206-210.
- Eysenck, H. J. y Eysenck, S. B. G. (1964). *Manual of the Eysenck Personality Inventory.* Londres: London University.
- Eysseric, H.; Gonthier, B.; Soubeyran, A.; Bessard, G.; Saxod, R. y Barret, L. (1997). Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 21: 6. 1018-1023.
- Faiman, M. D. (1979). Biochemical pharmacology of disulfiram. En E. Majchrowicz y E. P. Noble (eds). *Biochemistry and Pharmacology of ethanol.* New York. Plenum Press. Vol. 2. 325-348.
- Faiman, M. D.; Artman, L. y Haya. (1980). Disulfiram distribution and elimination en the rat after oral and intraperitoneal administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 4: 4. 412-419.
- Faiman, M. D.; Artman, L. y Maziasz, T. (1983). Diethyldithiocarbamic acid-methyl ester distribution, elimination, and LD<sub>50</sub> in the rat after intraperitoneal administration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 7: 3. 307-311.
- Faiman, M. D.; Dodd, D. E. y Hanzlik, R. (1978). Distribution of S<sup>35</sup>-disulfiram and metabolites in mice, and metabolism of S<sup>35</sup>-disulfiram in the dog. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology.* 21: 543-567.
- Faiman, M. D.; Dodd, D. E.; Nolan, R. J.; Artman, L. y Hanzlik, R. E. (1977). A rapid and simple radioactive method for the determination of disulfiram and its metabolites from a single sample of



- biological fluid or tissue. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 17: 3. 481-496.
- Faiman, M. D.; Jensen, J. C. y Lacoursiere, R. B. (1984). Elimination kinetics of disulfiram in alcoholics after single and repeated doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 36: 520-526.
- Faiman, M. D. y Madan, A. (1993). Role of flavin-dependent monooxygenases and cytochrome P-450 isozymes in the formation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide (DETC-MeSO), the proposed active metabolite of disulfiram. *Toxicology*. 13: 66.
- Feinstein, R.N.; Berliner, S. y Green, F.O. (1958). Mechanism of inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Archives of biochemistry and biophysics*. 76: 32-44.
- Ferencz-Biro, K. y Pietruszko, R. (1984a). Human aldehyde dehydrogenase. Catalytic activity in Oriental liver. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. 118: 97-102.
- Ferencz-Biro, K. y Pietruszko, R. (1984b). Inhibition of human aldehyde dehydrogenase isozymes by propionaldehyde. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 8: 3. 302-307.
- Ferguson, J. K. W. (1956). A new drug for alcoholism treatment. *Canadian Medical Assessment Journal*. 74: 793-795.
- Ferguson, R. A. y Goldberg, D. M. (1997). Genetic markers of alcohol abuse. *Clinical Chemical Acta. INC*. 257: 2. 199-250.
- Finney, J. W. y Monahan, S. C. (1996). The cost-effectiveness of treatment for alcoholism: A second approximation. *Journal of Studies on Alcohol*. 57: 3. 229-243.
- Fleischer, M.; Meiss, R.; Robenek, H.; Themann, H. y Eckard, R. (1980). Ultrastructural morphometric investigations on rat liver of young and adult rats after treatment with technical pentachlorophenol (PCP). *Archives of Toxicology*. 44: 243-257.
- Frye, G.D. y Breese, G.R. (1981). An evaluation of the locomotor stimulatory action of ethanol in the rat and mice. *Psychopharmacology*. 75: 372-379.
- Fukui, M. y Wakasugi, C. (1972). Liver alcohol dehydrogenase in a Japanese population. *Japanese Journal of Legal Medicine*. 26: 46-51.
- Fuller, R. K. y Roth, H. P. (1979). Disulfiram for the treatment of alcoholism. An evaluation in 128 men. *Annals of Internal Medicine*. 90: 6. 901-904.
- Gaines, T.B.; Kimbrough, R.D. y Linder, R.E. (1973). The toxicity of amitrole in the rat. *Toxicology Applied Pharmacology*. 26: 118-129.
- Gatch, M. B. y Lal, H. (1998). Pharmacological treatment of alcoholism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 22: 917-944.
- Gaunt, G. L. y DeDuve, C. (1976). Subcellular distribution of D-amino acid oxidase and catalase in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 26: 749-759.
- Gessner, P. K. (1993). Alcohols. En C. M. Smith y A. M. Reynard (eds.). *Farmacología*. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 254-272.

- Gessner, P. K. y Gessner, T. (1992a). Inhibition of aldehyde dehydrogenase. En P. K. Gessner y T. Gessner. *Disulfiram and its Metabolite, Diethyldithiocarbamate. Pharmacology and status in the treatment of alcoholism, HIV infections, AIDS and heavy metal toxicity*. 1ª edición. Londres. Chapman and Hall. 137-166.
- Gessner, P. K. y Gessner, T. (1992b). The disulfiram-ethanol reaction. En P. K. Gessner y T. Gessner. *Disulfiram and its Metabolite, Diethyldithiocarbamate. Pharmacology and status in the treatment of alcoholism, HIV infections, AIDS and heavy metal toxicity*. 1ª edición. Londres. Chapman and Hall. 167-203.
- Gessner, T y Jakubowski, M. (1972). Diethyldithiocarbamic acid methyl ester: A metabolite of disulfiram. *Biochemical Pharmacology*. 21: 219-230.
- Ghersi-Egea, J. F.; Perrin, R.; Leininger- Muller, B. (1993). Subcellular localization of cytochrome P450 and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical Pharmacology*. 45: 647-658.
- Gianoulakis, C. y de Waele, J. P. (1994). Role of the endogenous opioid system. *Metabolism and Brain Disorder*. 9: 105-131.
- Gill, K.; Amit, z. y 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.
- Gill, K.; France, G. y Amit, Z. (1986). Voluntary ethanol consumption in rats: an examination of blood/brain ethanol levels and behavior. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 10: 457-462.
- Gill, K.; Menez, J. F.; Lucas, D. y Deitrich, R. A. (1992). Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 16: 5. 910-915.
- Gill, K.; Shatz, K.; Amit, Z. y Ogren, S. O. (1986). Conditioned taste aversion to ethanol induced by zimeldine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 24: 463-468.
- Giri, P. R.; Linnoila, M.; O'Neill, J. B. y Goldman, D. (1989). Distribution and possible metabolic role of class III alcohol dehydrogenase in the human brain. *Brain Research*. 481: 131-141.
- Glassman, E. B.; McLaughlin, G. A.; Forman, D. T.; Felder, M. R. y Thurman, R. G. (1985). Role of alcohol dehydrogenase in the swift increase in alcohol metabolism (SIAM). Studies with deer mice deficient in alcohol dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. 34: 19. 3523-3526.
- Goedde, H. W.; Agarwal D. P.; Eckey, R. y Harada, S. (1985). Population genetic and family studies on aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. *Alcohol*. 2: 283-289.
- Goedde, H. W.; Agarwal D. P. y Harada, S. (1980). Genetic studies on alcohol metabolizing enzymes. Detection of isozymes in human hair roots. *Enzyme*. 25: 281-286.
- Goedde, H. W.; Agarwal, D. P. y Harada, S. (1979a). Alcohol metabolizing enzymes: studies of isozymes in human biopsies and cultured fibroblasts. *Clinical Genetics*. 16: 29-33.

- Goedde, H. W.; Agarwal, D. P.; Harada, S. (1983a). The role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isozymes in alcohol metabolism, alcohol sensitivity and alcoholism. Cellular localization, metabolism, and physiology. En Rattazzi, M. C.; Scandalio, J. G. y Whitt, G. S. (eds). *Isozymes, current topics in biological and medical research*. New York. Alan R. Liss. Vol. 8. 175-193.
- Goedde, H. W.; Agarwal D. P.; Harada, S. y Meier-Tackmann, D. (1982). ALDH polymorphism and alcohol sensitivity: Biochemical and population genetic studies. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 434.
- Goedde, H. W.; Agarwal, D. P.; Harada, S.; Meier-Tackmann, D.; Ruofu, D.; Bienzle, U.; Kroeger, A. y Hussein, L. (1983b). Population genetic studies on aldehyde dehydrogenase isozyme deficiency and alcohol sensitivity. *American Journal of Human Genetics*. 35: 769-772.
- Goedde, H. W. ; Harada, S. y Agarwal, D. P. (1979b). Racial differences in alcohol sensitivity: A new hypothesis. *Human Genetics*. 51: 3. 331-334.
- Goldman, D. y Enoch, M. A. (1990). Genetic epidemiology of ethanol metabolic enzymes: a role for selection. *World Review of Nutrition and Dietetics*. 63: 143-160.
- Goodman, J. Y. y Tephly, T. R. (1968). The role of hepatic microbody and soluble oxidases in the peroxidation of methanol in the rat and monkey. *Molecular Pharmacology*. 4: 5. 492-501.
- Goudie, A. J.; Thornton, E. W. Wheatley, J. 1975. Attenuation by alpha-methyltyrosine of amphetamine induced conditioned taste aversions in rats. *Psychopharmacologia*. 45: 119-123.
- Greenfield, N. J. y Pietruszko, R. (1977). Two aldehyde dehydrogenases from human liver: Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochemical and Biophysics Acta*. 483: 35-45.
- Grunnet, N.; Quistorff, B. y Thieden, H. I. D. (1973). Rate-limiting factors in ethanol oxidation by isolated rat liver parenchymal cells; effect of ethanol concentration, fructose, pyruvate and pyrazole. *European Journal of Biochemistry*. 40: 275-282.
- Hald, J. y Jacobsen, E. (1948). A drug sensitizing the organism to ethyl alcohol. *Lancet*. 2: 1001-1004.
- Hamby-Mason, R.; Chen, J. J.; Schenker, S.; Perez, A. y Henderson, G. I. (1997). Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 21: 6. 1063-1072.
- Handler, J. A.; Koop, D. R.; Coon, M. J.; Takei, Y. y Thurman, R. G. (1988). Identification of P-450ALC in microsomes from alcohol dehydrogenase-deficient deermice: contribution to ethanol elimination in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 264: 1. 114-124.
- Handler, J. A. y Thurman, R. G. (1988). Catalase-dependent ethanol oxidation in perfused rat liver. Requirement for fatty-acid-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by peroxisomes. *European Journal of Biochemistry*. 176: 2. 477-484.

- Hansson, T.; Tindberg, N.; Ingelman-Sundberg, M. y Kohler, C. (1990). Regional distribution of ethanol inducible cytochrome P450IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 34: 451-463.
- Harada, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1978a). Human liver alcohol dehydrogenase isozyme variation: Improved separation methods using prolonged high voltage starch gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Human Genetics*. 40: 215-220.
- Harada, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1978b). Isozyme variations in acetaldehyde dehydrogenase (E.C.1.2.1.3) in human tissues. *Human Genetics*. 44: 2. 181-185.
- Harada, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1980a). Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isozymes in various tissues. *Life Sciences*. 26: 1771-1780.
- Harada, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1982). Mechanism of alcohol sensitivity and disulfiram ethanol reaction. *Substance and Alcohol Actions Misuse*. 3: 107-115.
- Harada, S.; Agarwal, D. P.; Goedde, H. W. y Ishikawa, B. (1983a). Aldehyde dehydrogenase isozyme variation and alcoholism in Japan. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: Supl.1. 151-152.
- Harada, S.; Agarwal, D. P.; Goedde, H. W. y Takagi, S. (1983b). Blood ethanol and acetaldehyde levels in Japanese alcoholics and controls. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: 139-140.
- Harada, S.; Misawa, S; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1980b). Liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase un the Japanese: Isozyme variation and its possible role in alcohol intoxication. *American Journal of Human Genetics*. 32: 1. 8-15.
- Harada, S.; Misawa, S.; Agarwal, D. P. y Goedde, H. W. (1985). Aldehyde dehydrogenase polymorphism and alcohol metabolism in alcoholics. *Alcohol*. 2: 391-392.
- Hart, B. W. y Faiman, M. D. (1992). In vitro and in vivo inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochem Pharmacol*. 43: 403-406.
- Hart, B. W. y Faiman, M. D. (1993). Bioactivation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate to S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide. *Biochemical Pharmacology*. 46: 12. 2285-2290.
- Hart, B. W. y Faiman, M. D. (1994). In vivo pharmacodynamic studies of the disulfiram metabolite S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide: Inhibition of liver aldehyde dehydrogenase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 18: 2. 340-345.
- Hart, B. W.; Yourick, J. J. y Faiman, M. D. (1988). S-methyl-N,N,-diethylthiolcarbamate: A metabolite of disulfiram and its potential role in the disulfiram-ethanol reaction. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 12: 317.
- Hart, B. W.; Yourick, J. J. y Faiman, M. D. (1990). S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate: a disulfiram metabolite and potent rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Alcohol*. 7: 2. 165-169.

- Hashimoto, T.; Ueha, T.; Kuriyama, t.; Katsura, M y Kuriyama, K. (1989). Acetaldehyde-induced alterations in metabolism of monoamines in mouse brain. *Alcohol and Alcoholism*. 24: 91-99.
- He, X. X.; Nerbert, D. W.; Vasiliou, V.; Zhu, H. y Shertzer, H. G. (1997). Genetic differences in alcohol drinking preference between inbred strains of mice. *Pharmacogenetics*. 7: 3. 223-233.
- Heap, L.; Ward, R. J.; Abiaka, C.; Dexter, D.; Lawlor, M.; Pratt, O.; Thomson, A. Shaw, K. y Peters, T. J. (1995). The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism, and visual discrimination. *Biochemical Pharmacology*. 263-270.
- Heat, A. C. (1995). Genetic influences on drinking behavior in humans. En H. Begleiter y B. Kissin (eds). New York. Oxford University Press. 82-121.
- Heim, W.G.; Appleman, D. y Pyfrom, H.T. (1955). Production of catalase changes in animals with 3-amino-1,2,4-triazole. *Science*. 122: 693-694.
- Heim, W.G.; Appleman, D. y Pyfrom, H.T. (1956). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT) on catalase and other compounds. *American Journal of Physiology*. 19-23.
- Helander, A. y Johansson, B. (1989). Inhibition of human erythrocyte and leukocyte aldehyde dehydrogenase activities by diethylthiocarbamic acid methyl ester. An in vivo metabolite of disulfiram. *Biochemical Pharmacology*. 38: 13. 2195-2198.
- Helander, A. y Tottmar, O. (1986). Cellular distribution and properties of human blood aldehyde dehydrogenase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 10: 1. 71-76.
- Hellstrom, E. y Tottmar, O. (1982). Effects of aldehyde dehydrogenase inhibitors on enzymes involved in the metabolism of biogenic aldehydes in rat liver and brain. *Biochemical Pharmacology*. 31: 23. 3899-3905.
- Hellstrom, E.; Tottmar, O. y Widerlov, E. (1983). Effects of oral or implantation of disulfiram on aldehyde dehydrogenase activity in human blood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 7: 2. 231-236.
- Hempel, J. D.; Vallari, R. C. y Pietruszko, (1980). On the interaction of human liver aldehyde dehydrogenase E<sub>1</sub> isoenzyme with disulfiram and iodoacetamide. En R. G. Thurman (ed). *Alcohol and aldehyde metabolizing systems - IV*. New York. Plenum Press. 41-49.
- Higuchi, S. (1994). Polymorphisms of ethanol metabolizing enzyme genes and alcoholism. *Alcohol and Alcoholism*. 29: Suppl. 2. 29-34.
- Hillbom. M. E.; Sarviharju, M. S. y Lindros, K. O. (1983). Potentiation of ethanol toxicity by cyanamide in relation to acetaldehyde accumulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 70: 133-139.
- Holford, N. H. G. (1987). Clinical Pharmacokinetics of Ethanol. *Clinical Pharmacokinetics*. 13: 273-292.
- Holtzman, E. (1982). Peroxisomes in nervous tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 386: 523-525.

- Hoog, J. O.; Estonius, M. y Danielsson, O. (1994). Site-directed mutagenesis and enzyme properties of mammalian alcohol dehydrogenases correlated with their tissue distribution. *EXS*. 71: 301-309.
- Hoover, D. J. y Brien, J. F. (1981). Acetaldehyde concentration in rat blood and brain during the calcium-carbimide-ethanol interaction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 59: 65-70.
- Hsu, L. C.; Yoshida, A. y Mohandas, T. (1986). Chromosomal assignment of the genes for human aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2. *American Journal of Human Genetics*. 38: 641-648.
- Hunt, W. A. (1996). Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain – A review. *Alcohol*. 13: 2. 147-151.
- Iber, F.L.; Dutta, S.; Shamszad, M. y Krause, S. (1977). Excretion of radioactivity following administration of <sup>35</sup>sulfur-labeled disulfiram in man. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1: 359-364.
- Iborra, F. J.; Renau-Piqueras, J.; Portoles, M.; Boleda, M. D.; Guerri, C. y Pares, X. (1992). Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (Class III alcohol dehydrogenase) in the nucleus. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 40: 1865-1878.
- Inoue, K.; Fukunaga, M.; Kiriyaama, T. y Komura, S. (1984). Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive Japanese: Relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 8: 319-322.
- Inoue, K.; Kera, Y.; Kiriyaama, T. y Komura, S. (1985). Suppression of acetaldehyde accumulation by 4-methylpirazole in alcohol-hypersensitive Japanese. *Japanese Journal of Pharmacology*. 38: 43-48.
- Inoue, K. y Lindros, K. O. (1982). Subcellular distribution of human brain aldehyde dehydrogenase. *Journal of Neurochemistry*. 38: 4. 884-888.
- Inoue, K.; Ohbora, Y.; Fukunaga, M. y Yamasawa, K. (1982). Oxidation and uptake of acetaldehyde by intact human erythrocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 433.
- Inoue, K.; Rusi, M. y Lindros, K. O. (1981). Brain aldehyde dehydrogenase activity in rat strains with high and low ethanol preferences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 14: 1. 107-111.
- Ishii, H.; Suga, T. y Niinobe. S. (1977a). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole treatment on catalase activity and triglyceride level in fatty liver of the rat. *Biochemical Pharmacology*. 26: 625-628.
- Ishii, H.; Suga, T. y Niinobe. S. (1977b). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on lipid metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 25: 1438-1440.
- Jacobsen, D. y MacMartin, K. (1996). 4-Methylpyrazole–Present Status. *Clinical Toxicology*. 34: 4. 379-381.

- Jacobsen, D.; Sebastian, C. S.; Blomstrand, R. y MacMartin, K. E. (1988). 4-Methylpyrazole: A controlled study of safety in healthy human subjects after single, ascending doses. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 12: 516-522.
- Jaffe, J. H.; Kranzler, H. R. y Ciraulo, D. A. (1992). Drugs used in the treatment of alcoholism. En J. H. Mendelson y N. K. Mello (eds). *Medical Treatment and Diagnosis of Alcoholism*. New York. McGraw-Hill, Inc. 421-461.
- Järbe, T. U. C.; Hiltunen, A. J. y Swedberg, M. D. B. (1982). Ethanol as a discriminative stimulus: Effects of cyanamide, acetaldehyde and chlormethiazole. *Medical Biology*. 60: 298-306.
- Jensen, J. C. y Faiman, M. D. (1986). Disulfiram-ethanol reaction in the rat. 1. Blood alcohol, acetaldehyde, and liver aldehyde dehydrogenase relationships. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 10: 1. 45-49.
- Jin, J.; Davis, M. R.; Hu, P. y Baillie, T. A. (1994). Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. *Chemical Research in Toxicology*. 7: 4. 526-533.
- Johansson, B. (1986). Rapid and sensitive on-line precolumn purification and high-performance liquid chromatographic assay for disulfiram and its metabolites. *Journal of Chromatography*. 378: 419-429.
- Johansson, B. (1989). Diethylthiocarbamic acid methyl ester: A suicide inhibitor of liver aldehyde dehydrogenase?. *Pharmacology and Toxicology*. 64: 471-474.
- Johansson, B. (1992). A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatrica Scandinavica Suppl*. 369. 15-26.
- Johansson, B.; Petersen, E. N. y Arnold, E. (1989). Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. *Biochemical Pharmacology*. 38: 7. 1053-1059.
- Jonsson, H.T.JR.; Walker, E.M.Jr.; Greene, W.B.; Hughson, M.D. y Henninigar, G.N. (1981). Effects of prolonged exposure to dietary DDT and PCB on rat liver morphology. *Archive Environment Contaminance Toxicology*. 10: 171-183.
- Jörnvall, H.; Hempel, J. y Vallee, B. (1987b). Structures of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Enzyme*. 37: 5-18.
- Jörnvall, H.; Höög, J.; Von Bahr-Lindström, H.; Johansson, J.; Kaiser, R. y Persson, B. (1987a). The biochemistry of alcohol and alcoholism. *Biochemica Society Transactions*. 625th meeting. London. Vol. 16. 223-227.
- Jörnvall, H.; Petersson, B.; Krook, M. y Hempel, J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenases. En T. N. Palmer. (ed). *The molecular pathology of alcoholism*. Oxford. Oxford University Press. 130-156.

- Julia, P.; Farres, J. y Pares, X. (1987). Characterization of three isozymes of rat alcohol dehydrogenase: Tissue distribution and physical and enzymatic properties. *European Journal of Biochemistry*. 162: 179-189.
- Kager, L. y Eriksson, J. L. E. (1974). Long-term toxicity study with alcohol and 4-methylpyrazole in rat. *Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica*. 82: 534-538.
- Kalant, H. (1971). Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. En B. Kissin y H. Begleiter (eds). *The Biology of Alcoholism*. Biochemistry. New York. Plenum Press. Vol 1. 1-62.
- Kasalder, J. (1963). Formation of S-glucuronide from tetramethylthiuram disulfide (Antabuse) in man. *Biochimica et Biophysica Acta*. 71: 730-732.
- Kasza, L.; Weinberger, M.A.; Hinton, D.E.; Trump, B.F.; Patel, C.; Friedman, L. y Garthoff, L.H. (1978). Comparative toxicity of polychlorinated biphenyl and polybrominated biphenyl in the rat liver: Light and electron microscopic alterations after subacute dietary exposure. *Journal Environment Pathology and Toxicology*. 1: 241-257.
- Kaufmann, S. y Friedman, S. (1965). Dopamine-B-hydroxylase. *Pharmacological Reviews*. 17: 71.
- Keilin, D. y Hartree, E. F. (1945). Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohol. *Biochemical Journal*. 39: 293-301.
- Kelley, A. E. (1993). Locomotor activity and exploration. En A. Sahgal (ed.). *Behavioral Neuroscience. A practical Approach*. New York. Oxford University Press. Vol. 2. 1-21.
- Kerr, J. T.; Maxwell, D. S. y Crabb, D. W. (1989). Immunocytochemistry of alcohol dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 13: 730-736.
- Kholer, C.; Eriksson, L. G.; Hansson, T.; Warner, M. y Gustafsson, J. A. (1988). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 in rat brain. *Neuroscience Letters*. 84: 109-114.
- Kimelberg, H. K. y Norenberg, M. D. (1989). Astrocytes. *Scientific American*. 260: 4. 66-76.
- Kitson, T. M. (1975). The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *Biochemical Journal*. 151: 407-412.
- Kitson, T. M. (1976). The effect of some analogues of disulfiram on the aldehyde dehydrogenases of sheep liver. *Biochemical Journal*. 155: 2. 445-448.
- Kitson, T. M. (1977a). The disulfiram-ethanol reaction. A review. *Journal of Studies on Alcohol*. 38: 1. 96-113.
- Kitson, T. M. (1977b). Reinvestigation of the chemical reaction between disulfiram and ethanol. *Journal of Studies of Alcohol*. 38: 2. 1771-1772.
- Kitson, T. M. (1991). Effect of some thiocarbamate compounds on aldehyde dehydrogenase and implications for the disulfiram ethanol reaction. *Biochemical Journal*. 278: 189-192.
- Klein, N. C. y Cunha, B. A. (1995). Third-generation cephalosporins. *Medical Clinical of North America INC*. 79: 4. 705-719.



- Koda, L. Y.; Madamba, S. G. y Bloom, F. E. (1984). Hypotensive response of ethanol in rats pretreated with disulfiram or nitrefazole. *Life Sciences*. 35: 1659-1665.
- Koe, B. K. y Tenen, S. S. (1970). Inhibiting action of n-butyraldoxime on ethanol metabolism and on natural preference of C57BL mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 174: 434-449.
- Koehling, U. M. y Amit, Z. (1992). Relationship between blood catalase activity and drinking history in a human population, a possible biological marker of the affinity to consume alcohol. *Alcohol and Alcoholism*. 27: 2. 181-188.
- Koehling, U. M. y Amit, Z. (1994). Effects of 3-amino-1,2,4-triazole on brain catalase in the mediation of ethanol consumption in mice. *Alcohol*. 11: 3. 235-239.
- Koehling, U. M.; Amit, Z. y 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: Clinical and Experimental Research*. 19: 5. 1096-1104.
- Koivisto, T. y Eriksson, C. J. P. (1994). Hepatic aldehyde and alcohol dehydrogenases in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Biochemical Pharmacology*. 48: 1551-1558.
- Koivisto, T. y Eriksson, C. J. P. (1997). Voluntary alcohol drinking and acetaldehyde metabolism in F<sub>2</sub> hybrid crosses of AA y ANA rats lines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 56: 3. 441-446.
- Koivula, T. (1975). Subcellular distribution and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase fractions. *Life Science*. 16: 1563-1570.
- Koivula, T.; Koivusalo, M. y Lindros, K. O. (1975). Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochemical Pharmacology*. 24: 1807-1811.
- Koivula, T.; Turner, A. J.; Huttunen, M. y Koivusalo, M. (1981). Subcellular and perisynaptic distribution of rat brain aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of Neurochemistry*. 36: 1893-1897.
- Koivusalo, M.; Baumann, M. y Uotila, L. (1989). Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and Class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*. 257: 105-109.
- Koop, D. R.; Morgan, E. T.; Tarr, G. E. y Coon, M. J. (1982). Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *Journal of Biological Chemistry*. 257: 14. 8472-8480.
- Korsten, M. A.; Matsuzaki, S.; Feinman, L. y Lieber, C. S. (1975). High blood acetaldehyde levels after ethanol administrations. *New England Journal of Medicine*. 292: 386-389.
- Kössel, H. (1973). *Biochemie*. En K. G. Verlag Herder. Herder Lexikon. Freiburg. 1-319.
- Kristenson, H. (1995). How to get the best out of Antabuse. *Alcohol and Alcoholism*. 30: 775-873.

- Kupari, M.; Lindros, K. O.; Hillbom, M.; Heikkilä, J. y Ylikahri, R. (1981). 4-Methylpyrazole compared with propanolol in the treatment of the calcium cyanamide-ethanol reaction. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 49: 4. 6.
- Kupari, M.; Lindros, K. O.; Hillbom, M.; Heikkilä, J. y Ylikahri, R. (1983). Cardiovascular effects of acetaldehyde accumulation after ethanol ingestion: Their modification by  $\beta$ -adrenergic blockade and alcohol dehydrogenase inhibition. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 7: 3. 283-288.
- Kwentus, J. y Major, L. (1979). Disulfiram in the treatment of alcoholism. A review. *Journal of Studies on Alcohol*. 40: 5. 428-446.
- Lallemant, F.; Kest, W.; Ward, R. J. y De Witte. (1999). Ethanol metabolism in acatalasemic rats. *Alcohol and Alcoholism*. 34: 3. 465.
- Lamboeuf, Y. y De Saint Blanquat, G. (1980). Effects of cyanamide and clofibrate on the enzymes of ethanol oxidation and on ethanol consumption in the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*. 243: 1. 17-26.
- Lamboeuf, Y.; De Saint Blanquat, G. y Derache, R. (1981). Mucosal alcohol dehydrogenase-and aldehyde dehydrogenase-mediated ethanol oxidation in the digestive tract of the rat. *Biochemical Pharmacology*. 30: 542-545.
- Lang, M.; Marselos, M. y Torronen, R. (1976). Modification of drug metabolism by disulfiram and diethylthiocarbamate. I. Mixed-function oxidase. *Chemico-Biological Interaction*. 15: 267-276.
- Larson, E. W.; Olincy, A.; Rummans, T. A. y Morse, R. M. (1992). Disulfiram treatment of patients with both alcohol dependence and other psychiatric disorders: A review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 16: 1. 125-130.
- Li, T. K.; Bosron, W. F. y Dafeldecker, W. P. (1977). Isolation of II alcohol dehydrogenase of human liver: Is it a determinant of alcoholism?. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74: 4378-4381.
- Li, T. K. y Magnes, L. J. (1975). Identification of a distinctive form of alcohol dehydrogenase in human livers with high activity. *Biochemical Biophysics and Research Communications*. 63: 202-208.
- Li, T. K. y Vallee, B. L. (1969). Alcohol dehydrogenase and ethanol metabolism. *Surgical Clinical of North America*. 49: 3. 577-82.
- Lieber, C. S. (1977). Metabolism of ethanol. En C. S. Lieber (ed). *Metabolic aspects of alcoholism*. Lancaster. MTP Press. 1-30.
- Lieber, C. S. y DeCarli, L. M. (1970). Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. In vitro characteristics and adaptative properties in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*. 36: 10. 2505-2512.
- Lin, R. C.; Zhou, F. C.; Fillenwarth, M. J. y Lumeng, L. (1993). Zonal distribution of protein-acetaldehyde adducts in the liver of rats fed alcohol for long periods. *Hepatology*. 18: 864-869.

- Lindros, K. O. (1975). Regulator factors in hepatic acetaldehyde metabolism during ethanol oxidation. En K. O. Lindros y C. J. P. Eriksson. The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. Helsinki. Finnish Foundation for Alcohol Studies. 67-81.
- Lindros, K. O. (1978). Acetaldehyde - its metabolism and role in the actions of alcohol. En Y. Israel, F. B. Glaser, H. Kalant, R. E. Popham, W. Schmidt y R. G. Smart (eds). Research Advances in Alcohol and Drug Problems. New York. Plenum Press. 4: 111-176.
- Lindros, K. O. (1984). Research on experimental and inborn alterations of acetaldehyde metabolism: Implications for treatment of alcoholism. The Second Malmö Symposium on Alcohol. Malmö. A. B. Ferrosan. 115-125.
- Lindros, K. O. y Hillbom, M. E. (1979). Acetaldehyde in cerebrospinal fluid: its near-absence in ethanol-intoxicated alcoholics. *Medical Biology*. 57: 246-247.
- Lindros, K. O.; Koivula, T. y Eriksson, C. J. P. (1975). Acetaldehyde levels during ethanol oxidation: a diet-induced change and its relation to liver aldehyde dehydrogenases and redox states. *Life Sciences*. 17: 1589-1598.
- Lindros, K. O. y Sinclair, J. D. (1979). Decreasing acetaldehyde levels with 4-methylpyrazole does not increase voluntary ethanol drinking by rats. *Drug and Alcohol Dependence*. 4: 1-2. 95-96.
- Lindros, K. O.; Sinclair, J. D.; Ahtee, L. y Attila, L. M. J. (1981b). Effect of cyanamide on brain norepinephrine and dopamine. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 49: 4.
- Lindros, K. O.; Sipponen, P.; Pikkarainen, P.; Turunen, U. y Salaspuro, M. (1979). Alcoholic liver damage is provoked by 4-methylpyrazole, which prolongs the influence of ethanol but reduces acetaldehyde levels. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 3: 1. 78-82.
- Lindros, K. O. y Stowell, A. (1982). Effects of ethanol-derived acetaldehyde on the phosphorylation potential and on the intramitochondrial redox state in intact rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 218: 429-437.
- Lindros, K. O.; Stowell, A.; Pikkarainen, P. y Salaspuro, M. (1981a). The disulfiram (Antabuse)-alcohol reaction in male alcoholics: Its efficient management by 4-methylpyrazole. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 5: 4. 528-530.
- Litten, R. Z. y Allen, J. P. (1991). Pharmacotherapies for alcoholism: Promising agents and clinical issues. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 15: 620-633.
- Loomis, C. W. y Brien, J. F. (1983a). Inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by calcium carbimide (calcium cyanamide). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61: 9. 1025-1034.
- Loomis, C. W. y Brien, J. F. (1983b). Specificity of hepatic aldehyde dehydrogenase inhibition by calcium carbimide (calcium cyanamide) in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 61: 4. 431-435.

- Lundwall, L. y Baekeland, F. (1971). Disulfiram treatment of alcoholism. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 153: 6. 381-394.
- MacKerell, A. D. Jr.; Vallari, R. C. y Pietruszko, R. (1985). Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethyldithiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram. *FEBS Letters*. 179: 1. 77-81.
- Madan, A. y Faiman, M. D. (1994a). NADPH-dependent, regioselective S-oxidation of a thionosulfur- and thioether-containing xenobiotic, diethyldithiocarbamate methyl ester by rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 22: 2. 324-330.
- Madan, A. y Faiman, M. D. (1994b). Diethyldithiocarbamate methyl ester sulfoxide, an inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase and putative metabolite of disulfiram. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 18: 4. 1013-1017.
- Madan, A. y Faiman, M. D. (1995). Characterization of diethyldithiocarbamate methyl ester sulfine as an intermediate in the bioactivation of disulfiram. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 272: 2: 775-780.
- Madan, A.; Parkinson, A. y Faiman, M. D. (1993). Role of flavin-dependent monooxygenases and cytochrome P450 enzymes in the sulfoxidation of S-methyl N,N diethylthiolcarbamate. *Biochemical Pharmacology*. 46: 2291-2297.
- Magnusson, G.; Nyberg, J. A.; Bodin, N. O. y Hansson, E. (1972). Toxicity of pyrazole and 4-methylpyrazole in rat. *Experientia*. 28: 1198-1200.
- Mannerling, G. J.; Van Harken, D. R.; Makar, A.; Tephly, T. R.; Watkins, W. D. y Goodman, J. I. (1969). Role of intracellular distribution of hepatic catalase in the peroxidative oxidation of methanol. *Annals of New York Academy Sciences*. 168: 265-280.
- Marchner, H. y Tottmar, O. (1976a). Influence of the diet on the metabolism of acetaldehyde in rats. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 38: 59-71.
- Marchner, H. y Tottmar, O. (1976b). Inhibition of the acetaldehyde dehydrogenases in rat liver by a cyanamide derivative present in a commercial standard diet for small animals. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 39: 331-343.
- Marchner, H. y Tottmar, O. (1978). A comparative study on the effects of disulfiram, cyanamide and 1-amino-cyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 43: 219-232.
- Marchner, H. y Tottmar, O. (1983). Studies in vitro on the inactivation of mitochondrial rat-liver aldehyde dehydrogenase by the alcohol-sensitizing compound disulfiram cyanamide, 1-aminocyclopropanol and disulfiram. *Biochemical Pharmacology*. 32: 14. 2181-2188.
- Marconi, J.; Solari, G. y Gaete, S. (1960). Comparative clinical study of the effects of disulfiram and calcium carbimide. II. Reaction to alcohol. *Clínica Psiquiátrica*. Universidad de Chile. 46-51.

- Mardones, J. y Segovia-Riquelme, N. (1983). Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehavior toxicology and Teratology*. 5: 171-178.
- Margoliash, E. y Novogrodsky, A. (1958). A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole. *Biochemical Journal*. 68: 468-475.
- Margoliash, E.; Novogrodsky, A. y Schejter, A. (1960). Irreversible reaction of 3-amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. *Biochemical Journal*. 74: 339-350.
- Maring, J. A.; Weigand, K.; Brenner, H. D. y Von Wartburg, J. P. (1982). Aldehyde oxidizing capacity of erythrocytes in normal and alcoholic individuals. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 433.
- Masso, P.D. y Kramer, P. A. (1981). Simultaneous determination of disulfiram and two of its dithiocarbamate metabolites in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 224: 457-464.
- Masuda, Y. (1988). Oxidation of diethyldithiocarbamate to disulfiram by liver microsomes in the presence of NADPH and subsequent loss of microsomal enzyme activity in vitro. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 62: 251-266.
- Matsubara, T.; Otsubo, S.; Ogawa, A.; Okamoto, J.; Yoshizaki, T.; Nishibe, Y.; Tochino, Y. y Hirai, E. (1986). A comparative study on the effects of disulfiram and B-lactam antibiotics on the acetaldehyde-metabolizing system in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. 42: 333-343.
- McKenna, O.; Arnold, G. y Holtzman, E. (1976). Microperoxisome distribution in the central nervous system of the rat. *Brain Research*. 117: 181-194.
- Mellor, C. S. y Sims, C. P. (1971). Citrated calcium carbimide/alcohol reaction—its severity and effectiveness as a deterrent. *British Journal of Addiction*. 66: 123-128.
- Messiha, F. S. (1985). Strain dependent effects of ethanol on mouse brain and liver alcohol-and aldehyde-dehydrogenase. *Neurobehavior Toxicology and Teratology*. 7: 2. 189-192.
- Mizoi, Y.; Kogama, M.; Fukunaga, T.; Ueno, Y.; Adachi, J. y Fujiwara, S. (1985). Polymorphism of aldehyde dehydrogenase and ethanol elimination. *Alcohol*. 2: 3. 393-396.
- Montoliu, C.; Sancho-Tello, M.; Azorin, I.; Burgal, M.; Vallés, S.; Renau-Piqueras, J. y Guerri, C. (1995). Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 2561-2570.
- Montoliu, C.; Valles, S.; Renau Piqueras, J. y Guerri, C. (1994). Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Journal of Neurochemistry*. 63: 1855-1862.
- Morgan, E. T.; Koop, D. R. y Coon, M. J. (1982). Catalytic activity of cytochrome P450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *Journal of Biological Chemistry*. 257: 13951-13957.

- Motavkin, P. A.; Okhotin, V. E.; Konovko, O. O. y Zimatkin, S. M. (1990). Localization of aldehyde- and alcohol dehydrogenase in the human spinal cord and brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2: 79-84.
- Mottin, J. L. (1973). Drug-induced attenuation of alcohol consumption. A review and evaluation of claimed, potential or current therapies. *Quarterly Journal of Studies on Alcohol*. 34: 444-472.
- Myers, R. D. y Melchior, C. L. (1975). Alcohol drinking in the rat after destruction of serotonergic and catecholaminergic neurons in the brain. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 10: 2. 363-378.
- Myers, R. D.; Ng, K. T. y Singer, G. (1982). Intravenous self-administration of acetaldehyde in the rat as a function of schedule, food deprivation and photoperiod. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 17: 807-811.
- Myers, R. D.; Ng, K. T. y Singer, G. (1984). Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration. *Experientia*. 40: 1008-1010.
- Myers, R. D. y Veale, W. L. (1969). Alterations in volitional alcohol intake produced in rats by chronic intraventricular infusions of acetaldehyde. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 100-113.
- Nagasawa, H. T.; DeMaster, E. G.; Redfern, B.; Shirota, F. N. y Goon, D. J. W. (1990). Evidence of nitroxyl in the catalase-mediated bioactivation of the alcohol deterrent agent cyanamide. *Journal of Medicinal Chemistry*. 33: 3120-3122.
- Nagasawa, H. T.; Elberling, J. A.; DeMater, E. G. y Shirota, F. N. (1989). N 1-alkyl-substituted derivatives of chlorpropamide as inhibitors of aldehyde dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 32: 6. 1335-1340.
- Nagasawa, H. T.; Goon, D. J. W.; DeMaster, E. G. y Alexander, C. S. (1977). Lowering of ethanol-derived circulating blood acetaldehyde in rats by D-penicillamine. *Life Sciences*. 20: 187-194.
- Nagasawa, H. T.; Kwon, C.; DeMaster, E. G. y Shirota, F. N. (1986). Prodrugs of cyanamide as (long-acting) alcohol deterrent agents. *Biochemical Pharmacology*. 35: 2. 129-132.
- Nakamura, A.; Hara, T. y Minakami, S. (1973). Intracellular distribution of hepatic catalase activity in rats treated with aminotriazole and allylisopropylacetamide. *Journal of Biochemistry*. 73: 47-53.
- Naslund, B. M. A.; Glauman, H.; Warner, M.; Gustafsson, J. A. y Hansson, T. (1988). Cytochrome P450 b and c in the rat brain and pituitary gland. *Molecular Pharmacology*. 33: 31-37.
- Nelson, G. H.; Kinard, F. W.; Aull, J. C. y Hay, B. S. (1956). Effect of aminotriazole on alcohol metabolism and hepatic enzyme activities in several species. *Journal of Studies on Alcohol*. 18: 343-348.
- Ng Cheong Ton, J. M. y Amit, Z. (1985). Acetaldehyde and morphine interaction in the preexposure conditioned taste aversion paradigm in the rat. *Neuroscience Letters*. 61. 131-134.

- Nicholls, P. (1962). The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 59: 414-420.
- Novikoff, A. B. y Novikoff, P. M. (1973). Microperoxisomes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 21: 963-966.
- Obach, R.; Valenti, C.; Valles, J; Valles, J. M. y Domenech, J. (1986). Bioavailability of cyanamide in fasted and unfasted rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 7: 273-280.
- Ogata, S. y Mizohata, M. (1973). Studies on atypical human liver alcohol dehydrogenase in Japanese. *Japanese Journal of Studies on Alcohol*. 8: 33-44.
- Omura, T. (1973). The induction of drug metabolism. En R. W. Estabrook y E. Lindenlaub (eds). F. K. Schattauer. New York. 161.
- Oshino, N.; Oshino, R. y Chance, B. (1973). The characteristics of peroxidatic reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochemical Journal*. 131: 555-567.
- Pardo, C. A.; Xu, Z.; Borchelt, D. R.; Price, D. L.; Sisodia, S. S. y Cleveland, D. W. (1985). Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92: 954-958.
- Pares, X. y Vallee, B. L. (1981). New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochemical and Biophysics Research Communications*. 98: 122-130.
- Park, J. Y.; Huang, Y. H.; Nagoshi, C. T.; Yuen, S.; Johnson, R. C.; Ching, C. A. y Bowman, K. S. (1984). The flushing response to alcohol use among Koreans and Taiwanese. *Journal of Studies on Alcohol*. 45: 481-485.
- Peachey, J. E., Brien, J. F.; Loomis, C. W. y Rogers, B. J. (1980). A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man: Symptom responses. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 4: 3. 322-329.
- Peachey, J. E.; Brien, J. F.; Zilm, D. H.; Loomis, C. W.; Hemy, M. F. y Maglana, S. M. (1981d). The calcium cyanamide-ethanol interaction in man. Effects of repeated ethanol administration. *Journal of Studies on Alcohol*. 42: 3. 208-216.
- Peachey, J. E.; Maglana, S.; Robinson, G. M.; Hemy, M. y Brien, J. F. (1981c). Cardiovascular changes during the calcium carbimide-ethanol interaction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 29: 1. 40-46.
- Peachey, J. E. y Sellers, E. M. (1981). The disulfiram and calcium carbimide acetaldehyde-mediated ethanol reactions. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 15: 89-97.
- Peachey, J. E.; Zilm, D. H. y Cappell, H. (1981e). "Burning off the antabuse": Fact or fiction?. *The Lancet*. 25: 943-944.

- Peachey, J. E.; Zilm, D. H. y Cappell, H. (1981a). Comparative study of the disulfiram-ethanol reaction and the carbimide-ethanol reaction in nonalcoholic men. II: Effects of repeated drinks. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 29: 2. 271.
- Peachey, J. E.; Zilm, D. H. ; Cappell, H. y Robertson, G. (1981b). Comparative study of the disulfiram-ethanol reaction and the carbimide-ethanol reaction in nonalcoholic men. I: Effects of initial alcohol exposure. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 29: 2. 271.
- Peachey, J. E.; Zilm, D. H.; Robinson, G. M.; Jacob, M. y Cappell, H. (1983). A placebo-controlled double-blind comparative clinical study of the disulfiram- and calcium carbimide-acetaldehyde mediated ethanol reactions in social drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 7: 2. 180-187.
- Peter, O. (1973). *Chemie*. En K. G. Verlag Herder. Herder Lexikon. Freiburg. 1-269.
- Petersen, D. R.; Erwin, V. G. y Deitrich, R. A. (1983). Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. *Research Monographs*. 9: 93-99.
- Petersen, E. N. (1992). The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatrica Scandinavica Suppl*. 369. 7-13.
- Pettersson, H. y Totmar, O. (1982). Inhibition of aldehyde dehydrogenases in rat brain and liver by disulfiram and coprine. *Journal of Neurochemistry*. 39: 3. 628-634.
- Phillips, T. J. y Shen, E. H. (1996). Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *International Review of Neurobiology*. 39: 243-282.
- Pietruszko, R. (1975). Mammalian liver alcohol dehydrogenase. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 56: 1-31.
- Pratt, A. G. y Turrens, J. F. (1990). Ascorbate- and hemoglobin-dependent brain chemiluminescence. *Free Radical Biology and Medicine*. 8: 319-325.
- Propping, P. (1977). Genetic control of ethanol action on the central nervous system: An EEG study in twins. *Human Genetics*. 35: 309-334.
- Pruñonosa, J.; Obach, R. y Vallès, J. M. (1986). Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 377: 253-260.
- Pruñonosa, J.; Sagristá, M. L. y Bozal, J. (1989). Inactivation of low-K<sub>m</sub> rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by cyanamide in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 38: 13. 2099-2105.
- Quintanilla, M. E. y Tampier, L. (1995). Acetaldehyde metabolism by brain mitochondria from UChA and UChB rats. *Alcohol*. 12: 6. 519-524.
- Quintanilla, M. E.; Tampier, L. y Mardones, J. (1980). Influence of 3-amino-1,2,4-triazole on paraldehyde and pentobarbital induced narcosis en rats. *IRCS Medical Science*. 8: 35.
- Rahwan, R. G. (1975). Toxic effects of ethanol: possible role of acetaldehyde, tetrahydroisoquinolines, and tetra-hydro-β-carboniles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 34: 3-27.
- Raskin, N. H. y Sokoloff, L. (1968). Brain alcohol dehydrogenase. *Science*. 162: 131-132.



- Raskin, N. H. y Sokoloff, L. (1970). Alcohol dehydrogenase activity in the rat brain and liver. *Journal of Neurochemistry*. 17: 1677-1687.
- Raskin, N. H. y Sokoloff, L. (1972). Enzymes catalyzing ethanol metabolism in neural and somatic tissue of the rat. *Journal of Neurochemistry*. 19: 273-282.
- Ravindranath, V. y Anandatheerthavarada, H. K. (1989). High activity of cytochrome P450 linked aminopyrine N-demethylase in mouse brain microsomes and associated sex-related differences. *Biochemical Journal*. 261: 769-773.
- Ravindranath, V.; Anandatheerthavarada, H. K. y Shankar, S. K. (1989). Xenobiotic metabolism in human brain. Presence of cytochrome P450 and associated mono-oxygenases. *Brain Research*. 496: 331-335.
- Ravindranath, V.; Anandatheerthavarada, H. K. y Shankar, S. K. (1990). NADPH cytochrome P450 reductase in mouse, rat and human brain. *Biochemical Pharmacology*. 39: 1013-1018.
- Reddy, B. V.; Boyadjieva, N. y Sarkar, D. K. (1995). Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on b-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of b-endorphin release. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 19: 2. 339-344.
- Reddy, B. V. y Sarkar, D. K. (1993). Effect of alcohol, acetaldehyde, and salsonisol on beta-endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcoholism. Clinical and Experimental Research*. 17: 6. 1261-1267.
- Reed, T. E.; Kalant, H.; Gibbins, R. J.; Kapur, B. M. y Rankin, J. G. (1976). Alcohol and acetaldehyde metabolism in Caucasians, Chinese and Amerinds. *Canadian Medical Assessment*. 115: 851-855.
- Reitze, H. K. y Seitz, K.A. (1985). Light and electron microscopical changes in the liver of mice following treatment with aminotriazole. *Experimental Pathology*. 27: 17-31.
- Ricciardi, B. R.; Saunders, J. B.; Williams, R. y Hopkinson, D. A. (1983). Identification of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase isoenzymes in human liver biopsy specimens. *Clinica Chimica Acta*. 130: 85-94.
- Rikans, L. E. (1987). The oxidation of acrolein by rat liver aldehyde dehydrogenases: Relation to allyl alcohol hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*. 15: 356-362.
- Rikans, L. E. (1990). Effects of ethanol on microsomal drug metabolism in aging female rats. II. Inhibition. *Mechanism of Aging Development*. 51: 139-148.
- Rikans, L. E.; Snowden, C. D. y Moore, D. R. (1990). Influence of aging on ethanol and acetaldehyde oxidation in females rat liver. *Gerontology*. 36: 185-192.
- Roth, J. A. (1993). Metabolismo de los fármacos. En C. M. Smith y A. M. Reynard (eds.). *Farmacología*. Madrid. Editorial Médica Panamericana.

- Rotzinger, S.; Aragón, C. M. G.; Rogan, F.; Amir, A. y Amit, Z. (1995). The nitric oxide synthase inhibitor Nw-nitro-l-arginine methylester attenuates brain catalase activity in vitro. *Life Sciences*. 56: 1321-1324.
- Rotzinger, S.; Smith, B. R. y Amit, Z. (1994). Catalase inhibition attenuates the acquisition of ethanol and saccharin-quinine consumption in laboratory rats. *Behavioural Pharmacology*. 5: 203-209.
- Rout, U. K. (1992). Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 16: 2. 286-289.
- Ryan, D. E.; Koop, D. R.; Thomas, P. E.; Coon, M. J. y Levin, W. (1986). Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 246: 2. 633-644.
- Rydberg, U. y Neri, A. (1972). 4-Methylpyrazol as an inhibitor of ethanol metabolism: Differential metabolic and central nervous effects. *Acta Pharmacology and Toxicology*. 31: 421-432.
- Saigahl, D.; Cunningham, S. J.; Farres, J. y Weiner, H. (1991). Molecular cloning of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene of *Saccharomyces cerevisiae* by genetic complementation. *Journal of Bacteriology*. 173: 3199-3208.
- Salaspuro, M. P.; Pikkarainen, P. y Lindros, K. O. (1977). Ethanol-induced hypoglycemia in man: Its suppression by the alcohol dehydrogenase inhibitor 4-methylpyrazole. *European Journal of Clinical Investigation*. 7: 487-490.
- Sánchez-Turet, M. (1999). Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos del alcohol. En M. Sánchez-Turet (ed). *Enfermedades y problemas relacionados con el alcohol*. Barcelona. Espaxs. 53-61.
- Sanders, B.; Danko, G. P. y Ching, B. (1980). Cardiovascular responses of Oriental and Caucasian men to alcohol: Some psychological correlates. *Journal of Studies on Alcohol*. 21: 93-104.
- Sanny, C. G. y Rymas, K. (1993). In vivo effects of disulfiram and cyanamide on canine liver aldehyde dehydrogenase isozymes as detected by high-performance (pressure) liquid chromatography. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 17: 5. 982-987.
- Sasame, H. A.; Ames, M. M. y Nelson, S. D. (1977). Cytochrome P450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of reactive catechol metabolites. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 78: 919-926.
- Schenker, T. M.; Teeple, L. J. y Von Wartburg, J. P. (1971). Heterogeneity and polymorphism of human liver alcohol dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*. 24: 271-279.
- Schlesinger, K.; Kakihana, R. y Bennet, E. L. (1966). Effects of tetraethylthiuramdisulfide (Antabuse) on the metabolism and consumption of ethanol in mice. *Psychosomatic Medicine*. 28: 4. 514-520.
- Schuckit, M. A. (1980). Alcoholism and genetics, possible biological mediators. *Biological Psychiatry*. 15: 3. 437-447.

- Schuckit, M. A. y Raves, V. (1979). Ethanol digestion: Differences in blood acetaldehyde concentrations in relatives of alcoholics and controls. *Science*. 203: 54-55.
- Schwitters, S. Y.; Johnson, R. C.; McClearn, G. E. y Wilson, J. R. (1982). Alcohol use and the flushing response in different racial-ethnic groups. *Behavior Genetics*. 43: 1259-1262.
- Semsei, Y.; Rao, G. y Richardson, A. (1991). Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mechanisms of Aging Development*. 58: 13-19.
- Shean, M. L. y Dueter, G. (1983). The role of alcohol dehydrogenase in retinoic acid homeostasis and fetal alcohol syndrome. *Alcohol and Alcoholism*. Suppl. 2. 51-56.
- Sheppard, J. R.; Albersheim, P. y McClean, G. (1970). Aldehyde dehydrogenase and ethanol preference in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 245: 2876-2882.
- Shibuya, A. (1993). Abstract. Genotypes of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their significance for alcohol sensitivity. *Nippon Rinsho*. INC. 51: 2. 394-399.
- Shigeta, Y.; Nomura, F.; Iida, S.; Leo, M. A.; Felder, M. R. y Lieber, C. S. (1984). Ethanol metabolism in vivo by the microsomal ethanol-oxidizing system in deermice lacking alcohol dehydrogenase (ADH). *Biochemical Pharmacology*. 33: 5. 807-814.
- Shiohara, E.; Tsukada, M.; Chiba, S.; Yamazaki, H.; Nishiguchi, K.; Miyamoto, R. y Nakanishi, S. (1984). Subcellular aldehyde dehydrogenase activity and acetaldehyde oxidation by isolated intact mitochondria of rat brain and liver after acetaldehyde treatment. *Toxicology*. 30: 1. 25-30.
- Shirota, F. N.; DeMaster, E. G.; Elberling, J. A. y Nagasawa, H. T. (1980). Metabolic depropargylation and its relationship to aldehyde dehydrogenase inhibition in vivo. *Journal of Medical Chemistry*. 23: 6. 669-673.
- Shirota, F. N.; DeMaster, E. G.; Kwon, C. H. y Nagasawa, H. T. (1987b). Metabolism of cyanamide to cyanide and an inhibitor of aldehyde dehydrogenase (ALDH) by rat liver microsomes. *Alcohol and Alcoholism*. 1: 219-223.
- Shirota, F. N.; DeMaster, E. G. y Nagasawa, H. T. (1982b). Studies on the cyanamide-ethanol interaction. Dimethylcyanamide as an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 31: 11. 1999-2004.
- Shirota, F. N.; DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. (1985). Studies on the cyanamide-ethanol interaction. Dimethylcyanamide as an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 31: 1999-2004.
- Shirota, F. N.; DeMaster, E. G. y Nagasawa, H. T. (1987a). Cyanide is a product of the catalase-mediated oxidation of the alcohol deterrent agent, cyanamide. *Toxicology Letters*. 37: 1. 7-12.
- Shirota, F. N.; Goon, D. J. W.; DeMaster, E. G. y Nagasawa, H. T. (1996). Nitrosyl cyanide, a putative metabolic oxidation product of the alcohol-deterrent agent cyanamide. *Biochemical Pharmacology*. 52: 141-147.

- Shirota, F. N.; Kwon, C. H.; DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. (1982a). Identification of the major urinary metabolite of the potent aldehyde dehydrogenase inhibitor, cyanamide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 6: 313.
- Shirota, F. N.; Nagasawa, H. T.; Kwon, C. H. y DeMaster, E. G. (1984). Acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog, and man. *Metabolism and Disposition. Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 12: 3. 337-344.
- Shirota, F. N.; Stevens-Johnk, J. M.; DeMaster, E. G. y Nagasawa, H. T. (1997). Novel prodrugs of cyanamide that inhibit aldehyde dehydrogenase in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*. 40: 12. 1870-1875.
- Shivakumar, B. R.; Anandatheerthavarada, H. K. y Ravindranath, V. (1991). Free radical scavenging systems in developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 9: 181-185.
- Siew, C.; Deitrich, R. A. y Erwin, V. G. (1976). Localization and characteristics of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 176: 2. 638-649.
- Sinclair, J. D. (1990). Drugs to decrease alcohol drinking. *Annals of Medicine*. 22: 5. 357-62.
- Sinclair, J. D. y Gribble, P. A. (1985). Cyanamide injections during ethanol deprivation increase alcohol drinking. *Alcohol*. 2: 627-630.
- Sinclair, J. D. y Lindros, K. O. (1979). Acetaldehyde accumulation and voluntary ethanol intake by rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 3: 276-285.
- Sinclair, J. D. y Lindros, K. O. (1981). Suppression of alcohol drinking with brain aldehyde dehydrogenase inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 14: 3. 377-383.
- Sinclair, J. D.; Lindros, K. O. y Tehro, K. (1980). Aldehyde dehydrogenase inhibitors and voluntary ethanol drinking by rats. En R. G. Thurman (ed). *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*. New York. Plenum Press. Vol. 4. 481-487.
- Sinet, P. M.; Heikkila, R. E. y Cohen, G. 1980. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 34: 1421-1428.
- Sippel, H. W. (1974). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol metabolism. *Journal of Neurochemistry*. 23: 451-452.
- Sippel, H. W. y Eriksson, C. J. P. (1975). The acetaldehyde content in rat brain during ethanol oxidation. K. O. Lindros y C. J. P. Eriksson (eds). *The Finnish Foundation for Alcohol Studies*. Vol. 23. 149-157.
- Sklar, L. S. y Amit, Z. (1977). Manipulations of catecholamine systems block the conditioned taste aversion induced by self-administered drugs. *Neuropharmacology*. 16: 649-655.
- Smith, B. R.; Amit, Z.; Aragón, C. M. G. y Socaransky, S. M. (1985). Neurobiological correlates of ethanol self-administration: the role of acetaldehyde. En C. A. Naranjo y E. M. Sellers (eds).

- Research Advances in New Psychopharmacological Treatments for Alcoholism. New York. Elsevier Science Publishers. 45-63.
- Smith, B. R.; Amit, Z. y Splawinsky, J. (1984). Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol*. 1: 193-195.
- Smith, B. R.; Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1997). Catalase and the production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addiction Biology*. 2: 277-289.
- Smith, B. R.; Segal, R. B. y Amit, Z. (1989). Administration of a GABA antagonist selectively attenuates an ethanol-induced conditioned taste aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 33: 269-271.
- Smith, B. R.; Spivak, K. J. y Amit, Z. (1990). Does acetaldehyde play a role in alcoholism?. En L. T. Kozlowski, H. M. Annis, H. D. Cappell, F. B. Glaser, M. S. Goodstadt, Y. Israel, H. Kalant, E. M. Sellers y E. R. Vingilis (eds.). *Research Advances in alcohol and Drugs Problems. Alcoholism*. 10. 1-13.
- Smith, M.; Hopkinson, D. A. y Harris, H. (1971). Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Annals of Human Genetics*. 34: 251-278.
- Smith, M.; Hopkinson, D. A. y Harris, H. (1973). Studies on the subunit structure and molecular size of the human alcohol dehydrogenase isozymes determined by the different loci ADH<sub>1</sub>, ADH<sub>2</sub>, ADH<sub>3</sub>. *Annals of Human Genetics*. 36: 401-414.
- Socaransky, S. M.; Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1985). Brain ALDH as a possible modulator of voluntary ethanol intake. *Alcohol*. 2: 2. 361-365.
- Socaransky, S. M.; Aragón, C. M. G.; Amit, Z. y Blander, A. (1984). Higher correlation of ethanol consumption with brain than liver ALDH in three strains of rats. *Psychopharmacology*. 84: 2. 250-253.
- Sohda, T.; Shimizu, M.; Kamimura, S. y Okumura, M. (1993). Immunohistochemical demonstration of ethanol-inducible P450 2E1 in rat brain. *Alcohol and Alcoholism*. 28: Suppl. 1B. 69-75.
- Sorbel, J.; Morzorati, S.; O'Connor, S.; Li, T.-K. y Christian, J. C. (1996). Alcohol effects on the heritability of EEG spectral power. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 20: 1523-1527.
- Spivak, K. y Amit, Z. (1987). The role of acetaldehyde-metabolizing enzymes in the mediation of ethanol consumption: An investigation using a simulated drinking bout. *Alcohol and Alcoholism*. 22: Supl. 1. 361-365.
- Spivak, K.; Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1987a). Alterations in brain aldehyde dehydrogenase activity modify ethanol-induced conditioned taste aversion. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 11: 513-517.
- Spivak, K.; Aragón, C. M. G. y Amit, Z. (1987b). Alterations in brain aldehyde dehydrogenase activity modify the locomotor effects produced by ethanol in rats. *Alcohol and Drug Research*. 7: 481-491.

- Sprince, H.; Parker, C. M. y Smith, G. G. (1979). Comparison of protection by L-ascorbic acid, L-cysteine, and adrenergic-blocking agents against acetaldehyde, acrolein, and formaldehyde toxicity: implications in smoking. *Agents and Actions*. 9: 4. 407-414.
- Sprince, H.; Parker, C. M.; Smith, G. G. y Gonzales, L. J. (1974). Protection against acetaldehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-2-methylthiazoline-4-carboxylic acid. *Agents and Actions*. 4: 125-130.
- Sprince, H.; Parker, C. M.; Smith, G. G. y Gonzales, L. J. (1975). Protective action of ascorbic acid and sulfur compounds against acetaldehyde toxicity: Implications in alcoholism and smoking. *Agents and Actions*. 5: 164-173.
- Stamatoyannopoulos, G.; Chen, S. H. y Fukui, F. (1975). Liver alcohol dehydrogenase in Japanese: high population frequency of atypical form and its possible role in alcohol sensitivity. *American Journal of Human Genetics*. 27: 6. 789-796.
- Stoil, M. J. (1988). The case of the missing gene. Hereditary protection against alcoholism. *Alcohol Health and Research World*. 130-136.
- Stoppani, A.; Schwarcz, M. y Fred, C. (1966). Action of zinc-complexing agents on nicotamide adenine dinucleotide-linked aldehyde dehydrogenases from yeast and liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 113: 464-477.
- Stowell, A.; Hillbom, M.; Salaspuro, M. y Lindros, K. O. (1980). Low acetaldehyde levels in blood, breath and cerebrospinal fluid of intoxicated humans as assayed by improved methods. En R. Thurman (ed). En *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems*. Vol. 4. 635-645.
- Stowell, A. R.; Johnsen, J.; Aune, H.; Vatne, K.; Ripel, A. y Morland, J. (1984). A reinvestigation of the usefulness of breath analysis in the determination of blood acetaldehyde concentrations. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 8: 5. 442-447-
- Stowell, A. R.; Johnsen, J.; Ripel, A. y Morland, J. (1986). Diphenhydramina and the calcium-ethanol reaction: A placebo-controlled clinical study. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 39: 5. 521-525.
- Stowell, A. R.; Lindros, K. O. y Salaspuro, M. P. (1980). Breath and blood acetaldehyde concentrations and their correlation during normal and calcium carbimide-modified ethanol oxidation in man. *Biochemical Pharmacology*. 29: 783-787.
- Strömme, J. H. (1963). Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content in human erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*. 12: 705-715.
- Strömme, J. H. (1965). Metabolism of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rats with demonstration of an in vivo ethanol induced inhibition of the glucuronic acid conjugation of the thiol. *Biochemical Pharmacology*. 14: 393-410.

- Strömme, J. H. (1966). Distribution and chemical forms of diethyldithiocarbamate and tetraethylthiuram disulphide (Disulfiram) in mice in relation to radioprotection. *Biochemical Pharmacology*. 15: 287-297.
- Suokas, A.; Kupari, M.; Pettersson, J. y Lindros, K. O. (1985). The nitrefazole-ethanol interaction in man: cardiovascular responses and the accumulation of acetaldehyde and catecholamines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 9: 221-227.
- Suwaki, H. y Ohara, H. (1985). Alcohol-induced facial *flushing* and drinking behavior in Japanese men. *Journal of Studies on Alcohol*. 46: 196-198.
- Svanas, G. W. y Weiner, H. (1985a). Enzymatic requirement for cyanamide inactivation of rat liver aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. 34: 8. 1197-1204.
- Svanas, G. W. y Weiner, H. (1985b). Use of cyanamide to determine localization of acetaldehyde metabolism in rat liver. *Alcohol*. 2: 1. 111-115.
- Svanas, G. W. y Weiner, H. (1985c). Aldehyde dehydrogenase activity as the rate-limiting factor for acetaldehyde metabolism in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 236: 36-46.
- Svensson, T. H. y Waldeck, B. (1973). Significance of acetaldehyde in ethanol-induced effects on catecholamine metabolism and motor activity in the mouse. *Psychopharmacology*. 31: 229-238.
- Switzman, L.; Fishman, B. y Amit, Z. 1981. Pre-exposure effects of morphine, diazepam and delta-9 THC on the formation of conditioned taste aversions. *Psychopharmacology*. 74: 149-157.
- Tabakoff, B.; Anderson, R. A. y Alivisatos, G. A. (1973). Enzymatic reduction of biogenic aldehydes in brain. *Molecular Pharmacology*. 9: 428-437.
- Tabakoff, B.; Anderson, R. A. y Ritzman, R. F. (1976). Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochemical Pharmacology*. 25: 1305-1309.
- Tabakoff, B. y Gelpke, C. C. (1975). Alcohol and aldehyde metabolism in brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 56: 141-164.
- Tabakoff, B. y Von Wartburg, J. P. (1975). Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochemical and Biophysics Research Communication*. 63: 4. 957-966.
- Takagi, T.; Alderman, J.; Gellert, J. y Lieber, C. S. (1986). Assessment of the role of non-ADH ethanol oxidation in vivo and in hepatocytes from deermice. *Biochemical Pharmacology*. 35: 20. 3601-3606.
- Tampier, L. y 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. y Quintanilla, M. E. (1991). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the hypothermic effect of ethanol and on ethanol tolerance development. *Alcohol*. 8: 279-282.

- Tampier, L.; Quintanilla, M. E.; Contreras, S.; Segovia-Requelme, N. y Mardones, J. (1984). Biological similarities and differences between rats genetically different in alcohol preference. *Alcohol and Alcoholism*. 19: 3. 203-209.
- Tampier, L.; Quintanilla, M. E. Letelier, C. y Mardones, J. (1988). Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on narcosis time and lethality of ethanol in UChA rats. *Alcohol*. 5: 5-8
- Tampier, L.; Quintanilla, M. E. y Mardones, J. (1979). Influence of 3-amino-1,2,4-triazole pretreatment on ethanol induced narcosis in rats. *IRCS Medical Science*. 7: 390.
- Tampier, L.; Quintanilla, M. E. y Mardones, J. (1980). Methanol, ethanol and acetaldehyde oxidation rates by homogenates of different brain regions of UChA and UChB rats. *IRCS Medical Science*. 8: 157-158.
- Tampier, L.; Quintanilla, M. E. y Mardones, J. (1985). Effects of diets decreasing ethanol consumption on acetaldehyde metabolism in UChA and UChB rats. *Alcohol and Alcoholism*. 20: 4. 411-416.
- Tampier, L.; Quintanilla, M. E. y Mardones, J. (1995). Effects of aminotriazole on ethanol, water, and food intake and on brain catalase in UChA and UChB rats. *Alcohol*. 12: 4. 341-344.
- Teng, Y. S. (1981). Human liver aldehyde dehydrogenase in Chinese and Asiatic Indians: Gene deletion and its possible implication in alcohol metabolism. *Biochemical Genetics*. 19: 107-113.
- Teng, Y. S.; Jehan, S. y Lie-Injo, L. E. (1979). Human alcohol dehydrogenase ADH<sub>2</sub> and ADH<sub>3</sub> polymorphism in ethnic Chinese and Indians of West Malasya. *Human Genetics*. 53: 87-90.
- Tennant, F. S. (1986). Disulfiram will reduce medical complications but not cure alcoholism. *Journal of the American Medical Association*. 256: 11. 1489.
- Tephly, T. R.; Mannering, G. J. y Parks, R. E. Jr. (1961). Studies on the mechanism of inhibition of liver and erythrocyte catalase activity by 3-amino-1,2,4-triazole (AT). *Journal Pharmacology Experther*. 134: 77-81.
- Teschke, R.; Hasumura, Y. y Lieber, C. S. 1976. Hepatic ethanol metabolism: respective role of alcohol dehydrogenase, the microsomal oxidizing system, and catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 175: 635-643.
- Theorell, H.; Yonetani, T. y Sjöberg, B. (1969). On the effect of some heterocyclic compounds on the enzymic activity of alcohol dehydrogenase. *Acta Chemica Scandinavica*. 23: 255-260.
- Thomasson, H. R.; Beard, J. D. y Li, T. K. (1995). ADH2 gene polimorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 19: 1495-1499.
- Thomasson, H. R.; Edenberg, H. J.; Crabb, D. W.; Mai, X. L.; Jerome, R. E.; Li, T.-K.; Wang, S.-P.; Lin, Y.-T.; Lu, R.-B. y Yin, S.-J. (1991). Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *American Journal of Human Genetics*. 48: 677-681.
- Thurman, R. G. y Handler, J. A. (1989). New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. *Drugs Metabolism Reviews*. 20: 679-688.



- Tindberg, N. e Ingelman-Sundberg, M. (1996). Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 67: 2066-2073.
- Toothaker, L. E. (1991a). Multiple comparisons for the two-way ANOVA. En L. E. Toothaker. *Multiple Comparisons for Researchers*. London. Sage Publications. 111-136.
- Toothaker, L. E. (1991b). Multiple comparisons procedures. En L. E. Toothaker. *Multiple Comparisons for Researchers*. London. Sage Publications. 34-66.
- Tottmar, S. O. y Hellstrom, E. (1979). Blood pressure response to ethanol in relation to acetaldehyde levels and dopamine-beta-hydroxylase activity in rats pretreated with disulfiram, cyanamide and coprine. *Acta of Pharmacology and Toxicology*. 45: 4. 272-281.
- Tottmar, S. O. y Hellström, E. (1983). Aldehyde dehydrogenase in blondo: a sensitive assay and inhibition by disulfiram. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: 1. 103-107.
- Tottmar, S. O. y Marchner, H. (1976). Disulfiram as a tool in the studies on the metabolism of acetaldehyde in the rat. *Acta of Pharmacology and Toxicology*. 38: 366-375.
- Tottmar, S. O.; Pettersson, H. y Kiessling, K. H. (1973). The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. *Biochemical Journal*. 135: 577-586.
- Towell, J. F.; Barboriak, J. J.; Townsend, W. F.; Kalbfleisch, J. H. y Wang, R. Y. H. (1986). Erythrocyte aldehyde dehydrogenase: Assay of a potential biochemical marker of alcohol abuse. *Clinical Chemistry*. 32: 5. 734-738.
- Tsibulsky, V. L. y Amit, Z. (1993). Tolerance to effects of high doses of ethanol: 1. Lethal effects in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 45: 465-472.
- Tu, G. C. y Israel, Y. (1995). Alcohol consumption by Orientals in North America is predicted largely by a single gene. *Behavior Genetics*. 25: 1. 59-65.
- Tuma, D. J.; Smith, S. L.; Sorrell, M. F. (1991). Acetaldehyde and microtubules. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 625: 786-792.
- Vallee, B. L. y Bazzone, T. J. (1983). Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. En Rattazzi, M. C.; Scandalio, J. G. y Whitt, G. S. (eds). *Isozymes, current topics in biological and medical research*. New York. A. R. Liss. Vol. 8.
- Vande Waa, E. A. y Tracy, J. W. (1993). Agentes antiparasitarios. En C. M. Smith y A. M. Reynard (eds). *Farmacología*. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 862-884.
- Verbanck, P. M. P. (1995). The pharmacological treatment of alcoholism: From basic science to clinical medicine. *Alcohol and Alcoholism*. 30: 6. 757-764.
- Ververka, K. A.; Johnson, K. L.; Mays, D. C.; Lipsky, J. J. y Naylor, S. (1997). Inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and its metabolite methyl diethylthiocarbamoyl-sulfoxide. *Biochemical Pharmacology*. 53: 511-518.

- Von Wartburg, J. P. y Bühler, R. (1984). Biology of disease. Alcoholism and aldehydism: new biomedical concepts. *Laboratory Investigation*. 50: 1. 5-15.
- Von Wartburg, J. P.; Bühler, R.; Maring, J. A. y Pestalozzi, D. (1983). The polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase and their significance for acetaldehyde toxicity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: 1. 123-125.
- Von Wartburg, J. P., Papenberg, J. y Aebi, H. (1965). An atypical human alcohol dehydrogenase. *Canadian Journal of Biochemistry*. 43: 889-898.
- Von Wartburg, J. P. y Schürch, P. M. (1968). Atypical human liver alcohol dehydrogenase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 151: 936-946.
- Wall, T. L.; Thomasson, H. R.; Schukit, M. A. y Ehlers, C. L. (1992). Subjective feelings of alcohol intoxication in Asians with genetic variations of ALDH2 alleles. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 16: 5. 991-995.
- Waller, M. B.; McBride, W. J.; Lumeng, L. y Li, T. K. (1982). Effects of intravenous ethanol and of 4-methylpyrazole on alcohol drinking in alcohol-preferring rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 17: 763-768.
- Walsh, M. J.; Truitt, E. B. y Davis, V. E. (1970). Acetaldehyde mediation in the mechanism of ethanol-induced changes in norepinephrine metabolism. *Molecular Pharmacology*. 6: 416-424.
- Warner, M. y Gustafsson, J. A. (1994). Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 91: 1019-1023.
- Warner, M.; Kholer, C.; Hansson, T. y Gustafsson, J. A. (1988). Regional distribution of cytochrome P450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P450 b and c. *Journal of Neurochemistry*. 50: 1057-1065.
- Weiner, H. (1979). Aldehyde dehydrogenase. Mechanism of action and possible physiological roles. En E. Majchrowicz y E. P. Nobel. *Biochemistry and Pharmacology of Etoh*. New York. Plenum Press.
- Weiner, H. (1987). Subcellular localization of acetaldehyde oxidation in liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 492: 25-34.
- Weiner, H. y Ardelt, B. (1984). Distribution and properties of aldehyde dehydrogenase in regions of rat brain. *Journal of Neurochemical*. 42: 1. 109-115.
- Weir, R.J.; Paynter, O.E. y Elsera, J.A. (1958). Toxicology of 3-amino-1,2,4-triazole. *Hormology*. 2: 13-15.
- Westcott, J. Y.; Weiner, H.; Schultz, J. y Myers, R. D. (1980). In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochemical Pharmacology*. 29: 411-417.
- Whitfield, J. B. (1994). ADH and ALDH genotypes in relation to alcohol metabolic rate and sensitivity. *Alcohol Alcohol Supplement*. INC. 2: 59-65.

- Wilkinson, C. F.; Hetnarski, K. y Hicks, L. J. (1974). Substituted imidazoles as inhibitors of microsomal oxidation and insecticide synergists. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 4: 299-312.
- Wilson, A.; Davidson, W. J.; Blanchard, R. y White, J. (1978). Disulfiram implantation. A placebo-controlled trial with two-year follow-up. *Journal of Studies on Alcohol*. 39: 5. 809-819.
- Winston, G. W. y Cederbaum, A. I. (1983a). Evidence for two ethanol oxidizing pathways in reconstituted mixed-function oxidase systems. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 18: Suppl 1. 189-94.
- Winston, G. W. y Cederbaum, A. I. (1983b). NADPH-dependent production of oxy radicals by purified components of the rat liver mixed function oxidase system. II. Role in microsomal oxidation of ethanol. *Journal of Biological Chemistry*. 258: 3. 1514-1519.
- Wolff, P. (1972). Ethnic differences in alcohol sensitivity. *Science*. 175: 449-450.
- Wolff, P. (1973). Vasomotor sensitivity to alcohol in diverse Mongoloid population. *American Journal of Human Genetics*. 25: 193-199.
- Yasmineh, W. G. y Theologides, A. (1993). Catalase as a roving scavenger of hydrogen peroxide: A hypothesis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 122: 110-114.
- Yin, S. J. (1994). Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol and Alcoholism*. Suppl. INC. 2: 133-119.
- Yoshida, A. (1992). Molecular genetics of human aldehyde dehydrogenase. *Pharmacogenetics*. 2: 4. 139-147.
- Yoshida, A. y Dave, V. (1985). Enzymatic activity of atypical Oriental types of aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Genetics*. 23: 585-590.
- Yoshida, A.; Huang, Y. y Ikawa, M (1984). Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 81: 258-261.
- Yoshida, A.; Rzhetsky, A.; Hsu, L. C. y Chang, C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European Journal of Biochemistry*. 251: 1. 549-557.
- Yourick, J. J. y Faiman, M. D. (1987). Diethyldithiocarbamate acid-methyl ester: A metabolite of disulfiram and its alcohol sensitizing properties in the disulfiram-ethanol reaction. *Alcohol*. 4: 463-467.
- Yourick, J. J. y Fayman, M. D. (1989). Comparative aspects of disulfiram and its metabolites in the disulfiram-ethanol reaction in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 38: 3. 413-421.
- Yourick, J. J. y Faiman, M. D. (1991). Disulfiram metabolism as a requirement for the inhibition of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. 42: 1361-1366.

- Zeiner, A. R.; Kegg, P.S.; Blackburn, M. y Stratton, R. (1983). Gender differences in peak acetaldehyde concentration after an acute dose of ethanol. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 5: 2. 201-204.
- Zemaitis, M. A. y Greenes, F. E. (1976). Impairment of hepatic microsomal drug metabolism in the rat during daily disulfiram administration. *Biochemical Pharmacology*. 25: 1355-1360.
- Zimatkin, S. M. (1991). Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *Journal of Neurochemistry*. 56: 1-11.
- Zimatkin, S. M. y Deitrich, R. A. (1995). Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 19: 5. 1300-1306.
- Zimatkin, S. M. y Deitrich, R. A. (1997). Ethanol metabolism in the brain. *Addiction Biology*. 2: 387-399.
- Zimatkin, S. M. y Lindros, K. O. (1989). A histochemical study of the distribution of aldehyde dehydrogenase activity in brain structures of rats with genetically different alcohol-related behaviour. *Alcohol*. 6: 4. 321-325.
- Zimatkin, S. M. y Lindros, K. O. (1990). Features of the brain aldehyde oxidizing system in rats with various alcohol resistance. *Voprosy Narkologii*. 3: 20-22.
- Zimatkin, S. M. y Lindros, K. O. (1994). Comparison of catalase and aldehyde dehydrogenase distribution in rat brain: are aminergic neurons affected by acetaldehyde?. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 19: 35.
- Zimatkin, S. M. y Lindros, K. O. (1996). Distribution of catalase in rat brain: aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol and Alcoholism*. 31: 2. 167-174.
- Zimatkin, S. M.; Liopo, A. V. y Deitrich, R. A. (1998). Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 22: 8. 1623-1627.
- Zimatkin, S. M.; Rout, U. K.; Koivusalo, M.; Bühler, R. y Lindros, K. O. (1992). Regional distribution of low-K<sub>m</sub> mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 16: 1162-1167.
- Zorzano, A. Herrera, E. (1990a). Differences in kinetic characteristics and in sensitivity to inhibitors between human and rat liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. *General Pharmacology*. 21: 5. 697-702.
- Zorzano, A. Herrera, E. (1990b). Differences in the kinetic properties and sensitivity to inhibitors of human placental, erythrocyte, and major hepatic aldehyde dehydrogenase isoenzymes. *Biochemical Pharmacology*. 39: 5. 873-878.

## **SIGLAS Y ABREVIATURAS**

**SIGLAS Y ABREVIATURAS**

4-MP	4-metilpirazol.
5-HT	5-hidroxitriptófano o serotonina.
AcH	acetaldehído.
ADH	alcohol deshidrogenasa.
ALDH	aldehído deshidrogenasa.
AT	3-amino-1,2,4-triazole.
BAS o NES	niveles de etanol en sangre.
CAS	condicionamiento de aversión al sabor.
CC	cianamida de calcio.
CCC	cianamida de calcio citrada.
CPL	condicionamiento de preferencia de lugar.
DA	dopamina.
DBH	dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.
DMC	dimetilcianamida.
DDTC	ácido dietildithiocarbamato.
DDTC-Me	éster metilo de dietildithiocarbamato.
DDTC-Me sulfine	metilo de dietildithiocarbamato sulfine.

DDTC-Me sulfone	metilo de dietildithiocarbamato sulfone.
DDTC-Me sulfoxide	metilo de dietildithiocarbamato sulfoxide.
DETC-Me	éster metilo S-metilo-N,N-dietilthiolcarbamato.
DETC-MeSO	S-metilo-N,N-dietilthiolcarbamato sulfoxide.
DMC	dimetilcianamida.
DOPAL	3,4-dihidroxifenilacetaldehído.
E1	isozima de la clase I.
E2	isozima de la clase II.
FMO	monooxigenasas que contienen flavienzimas.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno.
HPC	hidroperóxido cumene.
IC <sub>50</sub>	concentración que genera el 50% de inhibición.
i.c.v.	administración intracerebroventricular.
ID <sub>50</sub>	dosis que genera el 50% de inhibición.
i.p.	administración intraperitoneal.
i.v.	administración intraventricular.
Ki	constante de inhibición.
Km	constante de afinidad o constante de Michaelis.

LD <sub>50</sub>	dosis letal para el 50% de la muestra.
MAO	monoamino oxidasa.
NA	noradrenalina.
NAD	nicotinamida-adenín-dinucleótido.
NAD	nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido.
NADHP	nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido fosfato.
NBI	1-benzilimidazol.
NES	niveles de etanol en sangre.
NOI	N-octilimidazol.
p.o.	administración oral.
PB	fenobarbital.
RAC	respuesta acetaldehído-cianamida.
REC	respuesta etanol-cianamida.
RED	respuesta etanol-disulfirán.
REN	respuesta etanol-nitrefazol.
SNC	sistema nervioso central.
s.c.	administración subcutánea.
TG	triglicéridos.



THP tetrahidropapaverolinas.

THIQ tetrahydroisoquinolinas.

$V_{\max}$  velocidad máxima.

## **ÍNDICE GENERAL**

SUMARIO

PRESENTACIÓN ..... 4

**PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO.**

I. INTRODUCCIÓN. METABOLISMO DEL ETANOL..... 9

1.-Generalidades ..... 9

2.-Aspectos farmacocinéticos ..... 9

II. METABOLISMO PERIFÉRICO DEL ETANOL..... 12

1.-Oxidación hepática del etanol ..... 12

2.-Sistemas enzimáticos..... 12

2.1.-Alcohol deshidrogenasa (ADH)..... 12

2.1.1.-Aspectos generales..... 12

2.1.2.-Isozimas de la ADH: Composición y polimorfismo..... 13

2.1.3.-Variantes genéticas de la ADH..... 15

2.1.4.-ADH como marcador biológico: Actividad de ADH en  
sangre..... 17

2.2.-Sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) ..... 18

2.2.1.-Aspectos generales..... 18

2.2.2.-Citocromo P-450 ..... 19

2.2.2.1.-Generalidades ..... 19

2.2.2.2.-Inducción del citocromo P-450 2E1 ..... 20

2.3.-Catalasa ..... 22

2.3.1.-Aspectos generales..... 22

2.3.2.-Generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado ..... 23

2.4.-Aldehído deshidrogenasa (ALDH)..... 25

2.4.1.-Aspectos generales..... 25

2.4.2.-Isozimas ..... 27

2.4.2.1.-Composición y polimorfismo isoenzimático .....	27
2.4.2.2.-Bases moleculares y bioquímicas de la anormalidad en la ALDH <sub>2</sub> .....	29
2.4.3.-Aspectos genéticos .....	30
2.4.3.1.-Generalidades .....	30
2.4.3.2.-Formas de ALDH con alta y baja Km .....	31
2.4.3.3.-Genética molecular de la ALDH humana. ....	32
2.4.3.4.-Isozimas de ALDH y metabolismo de aminas biogénicas.....	33
2.4.3.5.-Deficiencia de ALDH en diferentes poblaciones. ....	34
2.4.3.6.-Isozima atípica de ALDH y sensibilidad al alcohol. ....	35
2.4.3.7.-Variación de isoenzimas e incidencia del alcoholismo en Japón. ....	36
2.4.3.8.-Implicaciones de la variación enzimática en el uso y abuso del alcohol.....	37
2.4.4.-ALDH y otros enzimas como marcadores del riesgo de alcoholismo .....	38
2.4.5.-Inhibidores de la ALDH .....	40
2.4.5.1.-Disulfirán.....	42
2.4.5.2.-Cianamida .....	43
2.4.5.3.-Coprina.....	44
2.4.5.4.-Pargilina y Reserpina .....	45
2.4.5.5.-Metiltetrazoletiol.....	45
2.4.5.6.-Nitrefazol.....	45

III. METABOLISMO CENTRAL DEL ETANOL .....	47
1.-Pruebas para la existencia de un metabolismo central del etanol.....	47
2.-Sistemas enzimáticos.....	48
2.1.-Alcohol deshidrogenasa (ADH):Localización cerebral .....	48
2.2.-Citocromo P-450 2E1:Localización cerebral .....	51
2.3.-Catalasa .....	53
2.3.1.-Localización cerebral.....	53
2.3.2.-Catalasa y metabolismo del etanol .....	55
2.3.3.-Estudios con poblaciones humanas .....	62
2.3.4.-La presencia de AcH en el cerebro .....	65
2.3.4.1.-Generalidades .....	65
2.3.4.2.-Pruebas genéticas .....	67
2.4.-Aldehído deshidrogenasa (ALDH).....	69
2.4.1.-Localización cerebral.....	69
2.4.2.-Estudios genéticos .....	72
2.4.3.-Estudios conductuales. El uso de inhibidores de la ALDH .....	76

**SEGUNDA PARTE: DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

I. OBJETIVOS .....	87
1.-Objetivos generales.....	87
2.-Objetivos específicos.....	87
II. PLAN DE TRABAJO.....	89
III. MATERIALES Y MÉTODO .....	91
1.-Sujetos .....	91
2.-Condiciones de alojamiento .....	91
3.-Dieta .....	92

4.-Estudios conductuales y bioquímicos.....	92
4.1.-Estudios conductuales.....	93
4.1.1.-Sustancias.....	93
4.1.2.-Aparataje.....	94
4.1.3.-Procedimiento experimental.....	94
4.2.-Estudios bioquímicos.....	95
4.2.1.-Productos químicos.....	95
4.2.2.-Aparataje.....	96
4.2.3.-Procedimiento experimental.....	96
 IV. FASES EXPERIMENTALES.....	 98
1.-Fase I: Efecto de la administración de AT.....	98
1.1.-Introducción teórica.....	98
1.1.1.-Aspectos generales.....	98
1.1.2.-Estudios in vitro.....	99
1.1.3.-Estudios in vivo.....	100
1.1.4.-Mecanismo de inhibición de la catalasa por el AT.....	101
1.1.5.-Mecanismo de reacción entre el etanol y la catalasa.....	102
1.1.6.-Estudios conductuales.....	104
1.2.-Experimentos.....	105
1.2.1.-Experimento n ° 1.....	105
1.2.2.-Experimento n ° 2.....	111
1.2.3.-Experimento n ° 3.....	117
1.2.4.-Experimento n ° 4.....	122
1.3.-Conclusiones.....	132
2.-Fase II: Efecto de la administración de 4-MP.....	133
2.1.-Introducción teórica: Aspectos generales.....	133
2.2.-Experimentos.....	139
2.2.1.-Experimento n ° 5.....	139
2.2.2.-Experimento n ° 6.....	145

2.3.-Conclusiones .....	153
3.-Fase III: Efecto de la administración de DDTC y de la interacción de DDTC y 4-MP .....	154
3.1.-Introducción teórica. ....	154
3.1.1.-Aspectos generales. El ácido dietildithiocarbamato .....	154
3.1.2.-Farmacocinética: Administración, absorción, distribución y metabolismo .....	155
3.1.2.1.-Administración, absorción y distribución .....	155
3.1.2.2.-Metabolismo.....	156
3.1.3.-Detección en tejidos.....	157
3.1.4.-Bioactivación.....	158
3.1.5.-Inhibición de la ALDH mitocondrial.....	162
3.1.6.-Inhibición de la ALDH eritrocitaria.....	170
3.1.7.-Otros tipos de ALDH.....	171
3.1.8.-Evidencia de la respuesta etanol-disulfirán (RED).....	171
3.1.9.-Otros efectos .....	173
3.1.10.-Efectos conductuales reforzantes.....	175
3.2.-Experimentos .....	177
3.2.1.-Experimento n ° 7 .....	177
3.2.2.-Experimento n ° 8 .....	184
3.2.3.-Experimento n ° 9 .....	190
3.2.4.-Experimento n ° 10 .....	197
3.3.-Conclusiones .....	205
4.-Fase IV: Efecto de la administración de cianamida y de la interacción de cianamida y 4-MP .....	206
4.1.-Introducción teórica .....	206
4.1.1.-Aspectos generales.....	206
4.1.2.-Bioactivación.....	207
4.1.3.-Biotransformación y metabolitos efectivos .....	211
4.1.4.-Inhibición de la catalasa y de la ALDH por la cianamida .....	215

4.1.4.1.-Interacción entre la cianamida y la catalasa .....	215
4.1.4.2.-Reacción entre ALDH y cianamida.....	218
4.1.5.-Reacción etanol-cianamida (REC) .....	221
4.1.6.-Efectos paradójicos.....	224
4.1.7.-Estudios conductuales.....	225
4.2.-Experimentos .....	234
4.2.1.-Experimento n ° 11 .....	234
4.2.2.-Experimento n ° 12 .....	241
4.2.3.-Experimento n ° 13 .....	247
4.2.4.-Experimento n ° 14 .....	255
4.3.-Conclusiones .....	262

### **TERCERA PARTE: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.**

I. DISCUSIÓN GENERAL.....	264
II. CONCLUSIONES CLOBALES.....	290
APÉNDICE: Esquemas y Figuras .....	292
BIBLIOGRAFÍA .....	302
SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	343
ÍNDICE GENERAL.....	347