



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y  
DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL**

**ALCOHOL ETÍLICO Y AMINOPEPTIDASAS  
CEREBRALES. UN ESTUDIO  
*IN VITRO* E *IN VIVO***

**PRESENTADA POR:  
MARÍA DOLORES MAYAS TORRES**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. JOSÉ M. MARTÍNEZ MARTOS  
DRA. DÑA. M<sup>a</sup> JESÚS RAMÍREZ EXPÓSITO**

**JAÉN, 12 DE MAYO DE 2003**

**ISBN 84-8439-190-6**



**ALCOHOL ETÍLICO Y AMINOPEPTIDASAS CEREBRALES.  
UN ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Mayas Torres**

**María Dolores**

**I.S.B.N** 84-8439-190-6

**Centro** Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud

**Departamento** Ciencias de la Salud



**Nombre y apellidos del autor/a**

---

Apellidos **MAYAS TORRES**

Nombre **MARÍA DOLORES**

**Título de la Tesis Doctoral**

---

**ALCOHOL ETÍLICO Y AMINOPEPTIDASAS CEREBRALES.  
UN ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Fecha de lectura**

---

**12 MAYO 2003**

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

---

Centro **Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud**

Departamento **Ciencias de la Salud**

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

---

Dirección de la Tesis **Dr. D. José M. Martínez Martos y Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Jesús Ramírez Expósito,**

Presidente/a del Tribunal **Dr. D. José López Barneo**

Vocales

**Dr. D. José Manuel Baeyens Cabrera**

**Dra. D<sup>a</sup> Amelia Aránega Jiménez**

**Dr. D. Manuel Ramírez Sánchez**

Secretario/a **Dra. D<sup>a</sup> Garbiñe Arechaga Maza**

**Calificación obtenida**

---

**SOBRESALIENTE CUM LAUDEM POR UNANIMIDAD**

## RESUMEN

El alcohol etílico es la sustancia psicoactiva más utilizada en el mundo después de la cafeína. Su consumo excesivo o crónico está asociado a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios en el SNC, además de provocar un efecto depresor sobre diversos centros nerviosos inhibidores. En este sentido, parece ser que los procesos neurodegenerativos que ocurren en el SNC están causados por varios mecanismos. Por un lado, pueden ocurrir deficiencias energéticas, a las que el SNC es especialmente vulnerable debido al alto metabolismo que desarrollan las neuronas y a su baja capacidad de almacenamiento de sustratos ricos en energía. Por tanto, fallos en la capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía o la simple necesidad de responder rápidamente a un mayor requerimiento de la misma, pueden disminuir la viabilidad neuronal. También, la hiperactividad de los neurotransmisores acídicos (Glu y Asp) conduce a que estas sustancias actúen como potentes toxinas endógenas, originando degeneración y muerte neuronal. Por último, la participación de los radicales libres originados como consecuencia del metabolismo (estrés oxidativo) es causa de gran importancia en los procesos neurodegenerativos, ya que provocan entre otros fenómenos, la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, alterando su estructura y provocando la muerte celular. Este conjunto de mecanismos no son excluyentes, sino que parecen compartir un proceso último, responsable del desarrollo de los procesos de degeneración, y que es el aumento excesivo de niveles de calcio libre citosólico.

En cualquier caso, y aparte de estos efectos degenerativos, la diversidad de efectos bioquímicos y del comportamiento inducidos por el alcohol, sugieren que este actúa a distintos niveles del SNC. Aunque muchos estudios se han centrado en la capacidad del alcohol para modificar de forma inespecífica la fluidez de las membranas y alterar la función de las proteínas que se insertan en ellas, existe un interés emergente en conocer el papel de las rutas neuroquímicas y los sistemas neurotransmisores/neuromoduladores implicados en esta adicción, ya que no se conoce bien como actúa el alcohol a nivel del SNC, ni la naturaleza exacta del alcoholismo como proceso patológico. Las AP son enzimas que hidrolizan uniones peptídicas cercanas al terminal amino de péptidos y polipéptidos y son consideradas como una de las principales vías de inactivación de los neuropéptidos y de la formación de péptidos activos mediante la hidrólisis de sus precursores. Las variaciones en las distintas actividades AP son importantes porque reflejan el estado funcional de sus correspondientes sustratos, pertenecientes a diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores. Así, la AlaAP y LeuAP junto con la TyrAP, pueden hidrolizar bradicininas, encefalinas y pueden tener incluso actividad angiotensinasa. La ArgAP se ha implicado en el metabolismo de la Met-encefalina y la Ang III. La CysAP hidroliza oxitocina y vasopresina. La AspAP y GluAP tienen como sustratos

fisiológicos la Ang II además de modificar el recambio de los aminoácidos excitadores. Finalmente, la pGluAP está involucrada en la regulación de distintos sustratos endógenos, en especial, la TRH.

En base a estos datos, en la presente Tesis Doctoral se ha planteado estudiar que capacidad tiene el alcohol etílico de producir neurodegeneración, analizando su capacidad de modificar los niveles normales de obtención de energía a nivel mitocondrial, o de provocar estrés oxidativo, analizando la producción de radicales libres generados durante el metabolismo normal, el grado de peroxidación lipídica y la formación de grupos carbonilo por oxidación de las proteínas celulares. Además, se plantea el estudio de la capacidad del alcohol etílico de modificar la actividad de los enzimas proteolíticos del tipo de las AP, encargadas de la inactivación de diversos neuropéptidos, como los péptidos opiáceos, oxitocina, vasopresina, TRH o los péptidos del SRA cerebral, y valorar la participación de estos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores en los efectos inducidos por el alcohol. De este modo se puede comprobar además la existencia o no de correlaciones entre las actividades AP y los procesos degenerativos inducidos por el etanol. Por último, se pretende analizar el papel que tiene el ión calcio en el desarrollo de estos procesos.

Para ello, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

1. Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
2. Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre la producción de radicales libres en sinaptosomas, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
3. Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre el nivel de peroxidación lipídica en sinaptosomas, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
4. Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre el nivel de oxidación de proteínas de sinaptosomas en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.

5. Estudio del efecto del etanol, bien añadido in vitro, bien administrado in vivo, sobre la actividad específica de un amplio espectro de actividades AP (AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP, pGluAP, LeuAP y TyrAP) en sinaptosomas y en su medio de incubación, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.

El análisis de los resultados nos permite concluir que:

1. El análisis de las actividades AP es importante porque refleja el estado funcional de sus correspondientes sustratos endógenos, los cuales tienen importantes funciones en diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores.
2. El alcohol tiene la capacidad de modular la actividad de diversas AP de corteza cerebral de ratón en situaciones basales y despolarizantes, tanto in vitro como in vivo y en distinta dirección dependiendo del enzima analizado y de la presencia o no de calcio en el medio de incubación. Las diferencias observadas en la calcio-dependencia entre las distintas actividades AP pueden deberse a la redistribución intracelular del calcio inducida por alcohol, independientemente de la presencia o no de calcio en el medio de incubación. El incremento de actividad AP observado en condiciones despolarizantes, puede ser el resultado de la liberación de estos enzimas al medio de incubación, sugiriendo que tanto los péptidos activos como los enzimas que los degradan pueden ser liberados juntos a la hendidura sináptica para regular la función neurotransmisora/neuromoduladora de dichos péptidos.
3. La administración in vitro de alcohol, este no provoca signos importantes de neurodegeneración. Sin embargo, la ingesta in vivo de alcohol provoca algunos signos de toxicidad que quedan evidenciados por la alteración de diversos parámetros del estrés oxidativo. No obstante, la capacidad moduladora del alcohol sobre la actividad de las AP no parece estar relacionada con fenómenos neurotóxicos inducidos por la administración in vitro o la ingesta in vivo de alcohol.

4. Los cambios en la actividad AP, obtenidos tras la administración in vitro o la ingesta in vivo de alcohol, pueden ser consecuencia del efecto directo del alcohol o de sus metabolitos, bien sobre los constituyentes de las membranas sinaptosomales, en las que ocurriría una perturbación física de la matriz lipídica, bien sobre las propias AP. Estas enzimas pueden formar parte del grupo de proteínas diana denominadas Elementos Receptivos para el Alcohol (ERA), del mismo modo que se ha descrito para otros complejos proteicos de membrana como los canales iónicos operados por ligando y otras proteínas implicadas en procesos neuronales de trasducción de señales.
5. Los efectos de la administración in vitro o la ingesta in vivo de alcohol sobre las actividades AP indican que diversos neuropéptidos, como los péptidos opiáceos, oxitocina, vasopresina, TRH o los péptidos del SRA cerebral, pueden estar implicados en los complejos mecanismos de acción del alcohol sobre el sistema nervioso, incluyendo los procesos de tolerancia y dependencia, y que esta participación puede estar mediada por las modificaciones inducidas en los sistemas enzimáticos encargados de regular la actividad de dichos neuropéptidos, actuando a nivel de sus procesos degradativos.
6. Los efectos del alcohol sobre el sistema nervioso son la suma de las interacciones de diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores. La contribución diferencial de cada sistema a estos efectos varía con la concentración de alcohol. Esto puede constituir la base neuroquímica del comportamiento diferencial de las actividades AP inducido por la administración in vitro o la ingesta in vivo de alcohol.

## ABSTRACT

Ethanol represents the most frequently used psychoactive drug in our society. Besides its well known depressor effect on several inhibitory nervous centres, chronic or acute ethanol consumption is associated with several degenerative and inflammatory disorders in the CNS. In this way, three main mechanisms are responsible for neurodegenerative processes affecting the CNS. The first is based on the existence of errors associated with the pathways responsible for cell energy metabolism. Secondly, there is a formation of free radicals for different reasons. Finally, there is hyperactivity of amino-acid neurotransmitters (Glu and Asp), which make that these substances work as strong endogenous toxins, causing neurodegeneration. However, these three mechanisms which induce degeneration and neurone death seem to share a common factor: the increase in free calcium levels in the cytosol. Apart from these degenerative effects, the diversity of biochemical and behavioral effects which are induced by ethanol, suggest that ethanol acts at different levels on the CNS. Most of the studies have been focused on the ethanol ability to modify inespecifically the fluidity of membranes, impairing a variety of membrane-bound functions, but there is an emergent interest to study the role of neurochemical routes and the neurotransmitter/neuromodulatory systems involved in this adicction.

Either the effect of ethanol on CNS or the exact nature of alcoholism as pathological process are not well understood.

Aminopeptidases (AP) are zinc metalloenzymes that hydrolyze peptide bonds near the N-terminal end of peptides and polypeptides. AP are considered one of the main pathways to neuropeptide disactivation and/or to active peptide formation by the hydrolysis of their precursors. Changes on AP activities reflect the functional status of their corresponding endogenous substrates, which belong to several neurotransmitter/neuromodulatory systems.

Aminopeptidase M (alanyl aminopeptidase, AlaAP, and leucyl aminopeptidase, LeuAP) and tyrosyl aminopeptidase (TyrAP, enkephalinase) may hydrolyze bradykinins, enkephalins and may also work as angiotensinases. Arginyl aminopeptidase (ArgAP, aminopeptidase B) is involved in the metabolism of methionine-enkephalin and angiotensin III. Cystyl aminopeptidase (CysAP) hydrolyzes oxytocin and vasopressin. Aminopeptidase A (aspartyl aminopeptidase, AspAP, and glutamyl aminopeptidase, GluAP) exerts angiotensinase activity. This enzyme may also modify the free amino acid pool through the release of N-terminal acidic aminoacids. Finally, pyroglutamyl aminopeptidase (pGluAP) removes N-terminal residues from peptides such as TRH in a highly selective manner.

In accordance to this, in the present work we have studied how ethanol produce neurodegeneration assaying the ability of ethanol to modify mitochondrial activity or the ability

for leading to changes on the normal level of free radical generation, protein oxidation and lipid peroxidation. We have studied too the ability of ethanol to modify the AP activities, which are in charge of the inactivation of several neuropeptides (opioid peptides, oxytocin, vasopressin, TRH or brain renin-angiotensin system peptides), and the role of these neurotransmitter/neuromodulatory systems on the ethanol effects. In this way we can corroborate if there is a correlation between AP activities and neurodegenerative processes. Finally, we wanted to analyze the role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the development of these processes. Experimental procedures were as follow:

1. Effects of ethanol on in vitro or in vivo mitochondrial activity of synaptosomes in basal or  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing or  $\text{Ca}^{2+}$ -free aCSF.
2. Effects of ethanol on in vitro or in vivo free radical generation of synaptosomes in basal or  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing or  $\text{Ca}^{2+}$ -free aCSF.
3. Effects of ethanol on in vitro or in vivo lipid peroxidation level of synaptosomes in basal or  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing or  $\text{Ca}^{2+}$ -free aCSF.
4. Effects of ethanol on in vitro or in vivo protein oxidation level of synaptosomes in basal or  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing or  $\text{Ca}^{2+}$ -free aCSF.
5. Effects of ethanol on in vitro or in vivo AP activities (AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP, pGluAP, LeuAP and TyrAP) of synaptosomes and their incubation medium in basal or  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -containing or  $\text{Ca}^{2+}$ -free aCSF.

We can conclude:

1. Changes on AP activities induced by ethanol are important as they may reflect the functional status of their corresponding endogenous substrates, which have important functions in several neurotransmitter/neuromodulatory systems.
2. Ethanol modifies differently mouse frontal cortex AP activities at the synapse level in basal (resting) and  $\text{K}^+$ -stimulated conditions, after in vitro or in vivo administration, depending on the presence or absence

of  $\text{Ca}^{2+}$ . Differences on calcium dependence of AP activities may be due to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  redistribution, which is induced by ethanol in an independent way to the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The increase of AP activities in  $\text{K}^+$ -stimulated conditions may probably be the result of the release of the enzymes from the synaptosomes to the incubation medium. This could indicate that active peptides and their degrading peptidases may be released together into the synaptic cleft in order to regulate the neurotransmitter/neuromodulatory function of these peptides.

3. In vitro ethanol administration does not produce important neurodegenerative signs. But after in vivo administration, ethanol induces little signs of toxicity. The modulatory effect of ethanol on AP activities seems not to be related to neurotoxicity which is induced by in vitro or in vivo ethanol administration.
4. The modulatory changes of ethanol on AP activities, after in vitro or in vivo ethanol administration, may be due to a direct effect of ethanol and/or its metabolites on AP activities or to their effects on the AP or on the constituents of synaptosomal membranes, where it would be possible a physical perturbation of the lipid matrix of neuronal membranes, possibly leading to changes in the activity of membrane-bound proteins. AP might be considered among a group of proteins called "Receptive Elements for Ethanol" (REE). Among these REE are multisubunits, membrane-bound proteins involved in neuronal signal transduction processes.
5. Ethanol may modulate the function of several active peptides that act in the CNS (opioid peptides, oxytocin, vasopressin, TRH or brain renin-angiotensin system), through the enzymes involved in their degradation, probably as a result of the complex interactions between ethanol and the CNS neurotransmitter/neuromodulatory systems, that are involved in ethanol tolerance and/or dependence.
6. Ethanol effects on the CNS are the sum of specific interactions with multiple neurotransmitter/neuromodulatory systems. The differential contribution of each neurotransmitter/neuromodulatory system depends on the ethanol concentration. This might constitute the

neurochemical basis for the differential behaviour of the AP activities that is induced by the in vitro or in vivo ethanol administration.



**Área de Fisiología  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud  
Universidad de Jaén**

**ALCOHOL ETÍLICO Y AMINOPEPTIDASAS CEREBRALES.  
UN ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

**María Dolores Mayas Torres  
Tesis Doctoral  
Jaén, 2003**





UNIVERSIDAD DE JAÉN  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA DE FISIOLÓGIA

D. José Manuel Martínez Martos y D<sup>a</sup> María Jesús Ramírez Expósito, Profesores Titulares de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, certifican que la Tesis Doctoral titulada “**Alcohol etílico y aminopeptidasas cerebrales. Un estudio *in vitro* e *in vivo***”, que presenta D<sup>a</sup> María Dolores Mayas Torres para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo, a su juicio, los requisitos exigidos para su presentación.

Jaén, 17 de marzo de 2003

Fdo.: Dr. J.M. Martínez Martos

Fdo.: Dra. M.J. Ramírez Expósito



*A mi familia.*



Finalizada la realización de esta Tesis Doctoral quiero expresar mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que en algún momento de mi andadura necesité y me ayudaron. A la Dra. María Jesús Ramírez Expósito y al Dr. José Manuel Martínez Martos infinitas gracias, porque sin saberlo despertaron mi curiosidad por el mundo de la investigación, por ayudarme y guiarme en este y mas caminos. Igualmente, hago extensivo mi agradecimiento a todos los miembros del Área de Fisiología, a la Dra. Garbiñe Aréchaga Maza, la Dra. Isabel Prieto Gómez y en especial al Dr. Manuel Ramírez Sánchez, por sus sabios consejos y apoyo. Por los buenos y mejores momentos juntas a María Jesús García López y María Pilar Carrera González, mis compañeras; a ellas les agradezco el haberme hecho mas llevadero el camino. Y los últimos agradecimientos, pero no menos importantes, a mi familia, especialmente a mi hermano y a mis padres, por su ánimo y apoyo incondicional, por estar ahí en todos esos momentos buenos y en los no tanto. Finalmente, recordar a “mis voluntarios”, mis ratoncillos, porque sin su colaboración si que no hubiese podido llevar a cabo este trabajo.

A todos ellos Gracias!!



El trabajo que aquí se presenta ha sido realizado en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén.

Parte de los resultados obtenidos han sido presentados al *First International Congress on Neuropsychology*, al *6th World Congress for Biomedical Sciences*, al *7th World Congress for Biomedical Sciences* y publicados en *Rev Neurol* 30: 128-131 (2000), *Arch Neurocién (Mex)* 5: 120-126 (2000), *Neurosci Lett* 293: 199-202 (2000), *Neurosci Res Commun* 27: 103-107 (2000), *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 381-383 (2001), *Rev Neurol* 32: 1031-1040 (2001), *Brain Res Bull* 57: 195-203 (2002), *Neurosci Res Commun* 30: 103-110 (2002), *Rev Neurol* 35: 784-793 (2002), *Alcohol Alcohol* (en prensa).

Para la realización de este trabajo se ha contado con la subvención de las Ayudas a los Grupos de Investigación de la Junta de Andalucía (CVI 221).





**ÍNDICE.**



I. Introducción.

1. Enzimas Proteolíticos.

1.1. Introducción.

1.2. Clasificación.

1.2.1. Endopeptidasas.

1.2.2. Exopeptidasas.

1.3. Resumen Histórico.

1.4. Aminopeptidasas.

1.4.1. Alanina Aminopeptidasa.

1.4.1.1. Alanina Aminopeptidasa Soluble.

1.4.1.2. Alanina Aminopeptidasa Microsomal.

1.4.2. Arginina Aminopeptidasa.

1.4.3. Cisteína Aminopeptidasa.

1.4.4. Aspartato Aminopeptidasa.

1.4.5. Glutamato Aminopeptidasa.

1.4.6. Piroglutamato Aminopeptidasa.

1.4.6.1. Piroglutamato Aminopeptidasa I.

1.4.6.2. Piroglutamato Aminopeptidasa II.

1.4.7. Leucina Aminopeptidasa.

1.4.8. Tirosina Aminopeptidasa.

1.5. Aminopeptidasas Cerebrales.

2. Alcohol Etílico y Sistema Nervioso Central.

2.1. Introducción.

2.2. Características Farmacocinéticas del Alcohol Etílico.

2.2.1. Absorción del Etanol.

2.2.2. Distribución del Etanol en los Diferentes Tejidos.

2.2.3. Metabolismo y Eliminación Enzimática del Etanol.

2.3. Mecanismos de Acción del Etanol.

2.4. Efectos del Alcohol Etílico a Nivel Periférico.

2.5. Efectos del Alcohol Etílico sobre el Sistema Nervioso Central.

2.5.1. Efectos a Nivel Molecular.

2.6. Alcohol Etílico y Neurodegeneración.

2.6.1. Cambios Estructurales y Funcionales.

2.6.2. Neurodegeneración y Tratamiento Crónico con Etanol.

2.6.3. Cambios Neuroquímicos en la Función de la Memoria.

2.7. Tolerancia.

2.7.1. Mecanismo de Tolerancia.

2.7.2. Tolerancia y Condicionamiento Clásico.

2.7.3. Tolerancia, Aprendizaje y Receptor NMDA.

- 2.7.4. Tolerancia y Refuerzo.
  - 2.8. Neuroadaptación y Dependencia al Etanol.
    - 2.8.1. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión GABA.
    - 2.8.2. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión de Glutamato.
    - 2.8.3. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión de Dopamina.
    - 2.8.4. Dependencia del Etanol e Interacciones Glutamato-Dopamina-GABA.
    - 2.8.5. Dependencia, Depresión y Disminución de Dopamina.
  - 2.9. Alcohol y Desarrollo Cerebral.
  
  - 3. Procesos Neurodegenerativos en el Sistema Nervioso Central.
    - 3.1. Introducción.
    - 3.2. Procesos Neurodegenerativos Inducidos por Deficiencias Energéticas.
    - 3.3. Neurotoxicidad Debida a Aminoácidos Excitadores.
    - 3.4. Procesos Neurodegenerativos Inducidos por Radicales Libres.
    - 3.5. Interacciones entre los Posibles Mecanismos que Causan Citotoxicidad en el Cerebro.
    - 3.6. Las Aminopeptidasas en los Procesos Neurodegenerativos del Sistema Nervioso Central.
  
  - 4. La Corteza Frontal de Roedores.
    - 4.1. Introducción.
    - 4.2. Estructura de la Corteza Frontal.
      - 4.2.1. Corteza Cingulada Anterior.
      - 4.2.2. Región Frontal.
  
  - 5. Sinaptosomas.
    - 5.1. Introducción.
    - 5.2. Propiedades Metabólicas de los Sinaptosomas.
    - 5.3. Potenciales de Membrana de los Sinaptosomas.
    - 5.4. Propiedades de Liberación del Neurotransmisor.
    - 5.5. Sinaptosomas y Calcio.
  
  - II. Hipótesis y Planteamiento.
  
  - III. Material y Métodos.
    - 1. Animales.
      - 1.1. Estudio *In Vitro*.
      - 1.2. Estudio *In Vivo*.
-

2. Obtención de Sinaptosomas.

3. Determinaciones.

- 3.1. Determinación de la Concentración de Etanol en Suero.
- 3.2. Determinación de la Actividad Mitocondrial.
- 3.3. Determinación de la Producción de Radicales Libres.
- 3.4. Determinación del Nivel de Peroxidación Lipídica.
- 3.5. Determinación del Nivel de Oxidación de Proteínas.
- 3.6. Determinación de las Actividades Aminopeptidasas.
  - 3.6.1. Recta de Calibrado de  $\beta$ -Naftilamina.
- 3.7. Determinación de Proteínas.
  - 3.7.1. Recta de Calibrado de Albúmina.

4. Análisis Estadístico.

5. Preparación de Reactivos.

- 5.1. Soluciones de Alcohol Etílico.
- 5.2. Soluciones de Sacarosa.
- 5.3. Medio de Incubación.
- 5.4. Medio de Incubación Libre de Calcio.
- 5.5. Solución de MTT.
- 5.6. Solución de Luminol.
- 5.7. Solución de Lucigenina.
- 5.8. Solución de Isopropanol Ácido.
- 5.9. Solución de Ácido Tricloroacético.
- 5.10. Solución de Ácido Tiobarbitúrico.
- 5.11. Solución de 2,4-Dinitrofenilhidrazina.
- 5.12. Preparación de Sustratos.
- 5.13. Tampón Acetato.
- 5.14. Solución de Sal Fast Garnet GBC.
- 5.15. Solución de  $\beta$ -Naftilamina.
- 5.16. Solución de Bradford.
- 5.17. Solución de Albúmina.

IV. Resultados.

1. Estudio *In Vitro*.

- 1.1. Efecto del Etanol sobre la Actividad Mitocondrial de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.

- 1.2. Efecto del Etanol sobre la Producción de Radicales Libres de Sinaptosomas de Corteza Frontal e Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.3. Efecto del Etanol sobre el Nivel de Peroxidación Lipídica de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.4. Efecto del Etanol sobre el Nivel de Oxidación de Proteínas de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.5. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Alanina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.6. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Arginina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.7. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Cisteína Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.8. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Aspartato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.9. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Glutamato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.10. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Piroglutamato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.11. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Leucina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
  - 1.12. Efecto del Etanol sobre la Actividad Específica de Tirosina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
2. Estudio *In Vivo*.
    - 2.1. Análisis de los Niveles de Alcohol en Suero de Ratón tras la Ingesta Crónica de Etanol.
    - 2.2. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol sobre la Actividad Mitocondrial de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
-

- 2.3. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol sobre la Producción de Radicales Libres de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.4. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol sobre el Nivel de Peroxidación Lipídica de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.5. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol sobre el Nivel de Oxidación de Proteínas de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.6. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Alanina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.7. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Arginina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.8. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Cisteína Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.9. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Aspartato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.10. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Glutamato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.11. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Piroglutamato Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.12. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Leucina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.
- 2.13. Efecto de la Ingesta Crónica de Etanol Sobre la Actividad Específica de Tirosina Aminopeptidasa de Sinaptosomas de Corteza Frontal de Ratón, en Condiciones Basales y Despolarizantes. Influencia del Calcio.

## V. Discusión.

### 1. Sobre la Metodología Empleada.

---

- 1.1. Sobre la Fracción Sinaptosomal Utilizada.
  - 1.2. Sobre el Ensayo con MTT como Índice del Comportamiento Bioenergético de los Sinaptosomas.
  - 1.3. Sobre el Método Quimioluminiscente para la Detección de Radicales Libres.
  - 1.4. Sobre las Sustancias que Reaccionan con el Ácido Tiobarbitúrico como Índice de Peroxidación Lipídica.
  - 1.5. Sobre la Formación de Grupos Carbonilo como Índice de la Oxidación de Proteínas.
  - 1.6. Sobre los Métodos de Determinación de las Actividades Aminopeptidasas.
2. Sobre los Resultados.
    - 2.1. Sobre los Parámetros de Estrés Oxidativo.
    - 2.2. Sobre las Actividades Aminopeptidasas.
      - 2.2.1. Sobre la Actividad de Aminopeptidasas Neutras (AlaAP, CysAP, LeuAP y TyrAP) y Básicas (ArgAP).
      - 2.2.2. Sobre la Actividad de Aminopeptidasas Ácidas (AspAP y GluAP).
      - 2.2.3. Sobre la Actividad de Omega-Peptidasas (pGluAP).
- VI. Conclusiones.
- VII. Bibliografía.





**I.**

**INTRODUCCIÓN.**

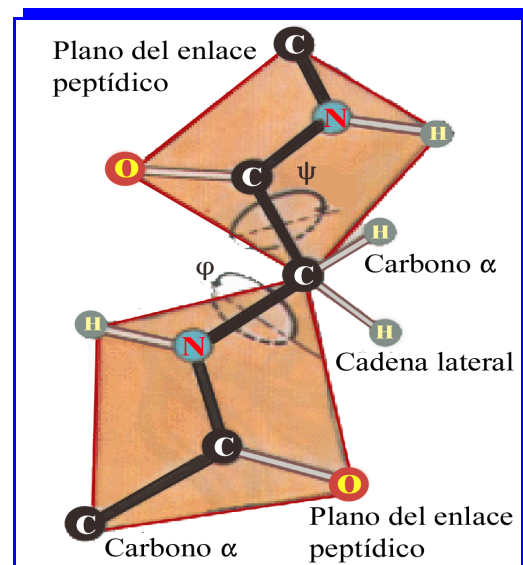


## 1. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS.

### 1.1. INTRODUCCIÓN.

Los enzimas proteolíticos son aquéllos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Existen varios términos que, aunque tuvieron mínimas diferencias de significado (Barrett y McDonald, 1986), hoy se usan indistintamente junto al de enzimas proteolíticos, y son proteasas, proteinasas y peptidasas (Barrett *et al.*, 1998).

Desde un punto de vista químico, un enlace peptídico (*figura I.1.1.*) es un enlace amido establecido entre el grupo  $\alpha$ -carboxílico de un aminoácido y el grupo  $\alpha$ -amino del siguiente aminoácido de una cadena polipeptídica (con pérdida de una molécula de agua). Los enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de este enlace se denominan hidrolasas, según la Lista de la Comisión de Enzimas (EC) (Webb, 1993).



**Figura I.1.1.** Esquema de un enlace peptídico y su representación tridimensional.

Esta primera lista, principalmente la parte encargada de las peptidasas (perteneciente a la clase 3, subclase 3.4.), ha experimentado la mayor revisión, basada en las recomendaciones de un grupo de expertos del Comité de Nomenclatura de la Unión de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), que todavía hoy sigue en ello ([www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html](http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html)). Además, por si queda la posibilidad de que hubiese limitaciones con la clasificación, para algunos de los enzimas aparece la clasificación denominada MEROPS, que asigna las peptidasas a familias en base a las similitudes de la secuencia de aminoácidos, y de

acuerdo a la estructura tridimensional los grupos de familias forman clanes (Barrett *et al.*, 1998).

Uno de los temas al que se ha dedicado gran parte de la investigación científica en los últimos años, ha sido el estudio del metabolismo proteico. El conocimiento de la maquinaria encargada de sintetizar proteínas (el anabolismo proteico), desde el proceso de transcripción del material genético hasta el mecanismo de traducción a nivel ribosomal, junto con las complejas modificaciones posttraduccionales, constituye un cuerpo de doctrina perfectamente coherente y sobradamente contrastado. Sin embargo, los procesos por los que las proteínas son nuevamente reducidas a sus pilares básicos, así como los mecanismos que regulan el catabolismo proteico, constituyen una laguna a pesar de que también se ha dedicado a este tema una considerable proporción de investigación experimental.

Todo lo que hoy se sabe sobre la degradación proteica se reduce al conocimiento de un determinado número de enzimas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, con capacidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Por otra parte, y a diferencia de los procesos anabólicos proteicos, todo este conocimiento se agrupa en una serie de datos que no presentan un nexo que interrelacione la actividad de unos enzimas con otros, ni con el resto del metabolismo celular, por lo que no se tiene aún un marco general donde pueda describirse una teoría del catabolismo proteico como un conjunto coherente de datos.

## 1.2. CLASIFICACIÓN.

Aunque actualmente resulte demasiado simplificado, clásicamente los enzimas proteolíticos se dividieron en exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan enlaces próximos (uno o dos residuos) a los extremos amino- o carboxi-terminales (N- o C-terminal, respectivamente) de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre enlaces distantes de los extremos de la cadena.

Dado que la especificidad de muchos de estos enzimas resulta demasiado compleja, debido a la existencia de enzimas con actividad exo- y endopeptidasa, (Singh y Kalnitsky, 1980) y ante la aparición de peptidasas que forman parte de complejos multicatalíticos (Tsukahara *et al.*, 1988), siempre habría que referirse a que un determinado enzima tiene una “actividad peptidasa” concreta, más que a que sea una peptidasa. En el presente trabajo se utilizará indistintamente una u otra terminología aun siendo conscientes de este problema de nomenclatura. Además, la nomenclatura de las peptidasas es dificultosa, la especificidad es difícil de definir dependiendo de la naturaleza de varios de los residuos aminoácidos del enlace

peptídico a hidrolizar y también de la conformación de la cadena polipeptídica sustrato.

La IUBMB clasificó a los enzimas proteolíticos en cinco clases o familias basándose en la comparación de sus centros activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional. Cada familia tiene un conjunto característico de residuos aminoácidos dispuestos en una configuración peculiar para formar el sitio activo. Además, cada clase de enzimas posee inhibidores característicos, lo que permite su clasificación dentro de un determinado grupo. Se cree que los miembros de cada familia descienden de una forma común ancestral por evolución divergente. Existen otros enzimas proteolíticos, actualmente aislados e identificados, que no pueden ser incluidos en esta clasificación hasta que no sea conocida la naturaleza de su centro activo y su mecanismo de acción (Barrett *et al.*, 1998). Estas cinco clases de enzimas proteolíticos basados en la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis son:

- Serina-peptidasas. Contienen al menos un resto de serina (Ser) en su centro activo y son inhibidas específicamente por di-isopropil-fosfluoridato. Entre ellas citar tripsina, Leu-endopeptidasa (Leu: leucina) o ProAP (Pro: prolina; AP: aminopeptidasa).
- Cisteína-peptidasas. Caracterizadas por poseer un grupo tiol (-SH) del aminoácido cisteína (Cys) en su centro activo. Activadas por ditioneitol (DTT) e inhibidas por 4-cloromercuribenzoato. Entre ellas se encuentran pGlu-peptidasa I (pGlu: piroglutamato) y Gly-endopeptidasa (Gly: glicina).
- Aspártico-peptidasas. Poseen un grupo carboxílico (usualmente del aspartato (Asp)) en su centro activo y son inhibidas por pepstatina. Como ejemplos renina y pepsina.
- Metalopeptidasas. Caracterizadas por tener uno o dos iones metálicos en su centro activo (en la mayoría de los casos  $Zn^{2+}$ ). Inhibidas por ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) y fosforamidón. Entre ellas se encuentran la mayoría de las AP, como son AlaAP, LeuAP o GluAP (Ala: alanina; Glu: glutamato).
- Peptidasas no clasificadas. Se incluyen aquí peptidasas de mecanismo catalítico desconocido tales como algunas dipeptidasas.

Como se ha dicho previamente, existe una clasificación diferente a la adoptada por la EC, que aun teniendo en cuenta el grupo catalítico, agrupa a las peptidasas en familias y clanes de acuerdo a la secuencia y estructura tridimensional:

- Una familia de peptidasas es un grupo en el que cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa en la secuencia de aminoácidos, al menos con un miembro de la familia, en la parte de la molécula que es

responsable de la actividad peptidasa (Reeck *et al.*, 1987). Cada familia de peptidasas se nombra con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A, M, U; para Ser, treonina (Thr), Cys, Asp, metalo o desconocida respectivamente), seguido de un número arbitrario. Cuando una familia desaparece, porque se fusiona con otra, el número no vuelve a ser utilizado.

- Clan es el término usado para describir a un grupo de familias cuyos miembros vienen de una sola proteína ancestral, que ha divergido tan rápidamente que no se ha podido probar la relación por comparación de la estructura primaria (Rawlings y Barrett, 1993; Barrett y Rawlings, 1995). La clara evidencia de la relación entre familias es la similitud entre las estructuras tridimensionales. El nombre del clan se forma con la letra del sitio catalítico (como para las familias) seguido de una segunda letra arbitraria. Si un clan desaparece el nombre no se vuelve a utilizar. No todas las familias pertenecen a un clan y cuando es necesario dar una asignación a esto se usa SX, CX, etc.

### 1.2.1. Endopeptidasas.

Se dividieron en base al metabolismo catalítico en:

- Ser-endopeptidasas
- Cys-endopeptidasas
- Asp-endopeptidasas
- metalopeptidasas

Nombrar también las oligopeptidasas, que actúan de forma óptima en sustratos menores que las proteínas.

### 1.2.2. Exopeptidasas.

Las exopeptidasas son enzimas hidrolíticas cuya acción se limita a uno de los terminales de la cadena polipeptídica. Se clasifican de acuerdo a la especificidad que muestran por un determinado sustrato y se les suele asignar un nombre convencional que indica el extremo del péptido (grupo  $\alpha$ -N o  $\alpha$ -C) frente al cual son activos y el tamaño del fragmento liberado (aminoácido, dipéptido o tripéptido).

Las exopeptidasas que requieren un grupo  $\alpha$ -N libre se denominan AP si liberan aminoácidos, dipeptidil-AP si liberan dipéptidos y tripeptidil-AP si liberan tripéptidos. Las exopeptidasas que requieren un grupo C-terminal no sustituido en los péptidos se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos.

Un tercer grupo de exopeptidasas son las denominadas dipeptidasas y tripeptidasas, cuyo principal atributo común es su especificidad por sustratos que poseen una determinada distancia (de dos o tres aminoácidos respectivamente) entre el grupo  $\alpha$ -N libre o el grupo  $\alpha$ -C libre. Esto da lugar a confusiones, ya que ciertas dipeptidasas y tripeptidasas parecen afectar a cadenas polipeptídicas mayores (Coffey y De Duve, 1968) y algunas AP pueden utilizar como sustratos dipéptidos y tripéptidos de diversa naturaleza (Felgenhauer y Glenner, 1966; Kania *et al.*, 1977).

Las omega ( $\Omega$ ) peptidasas agrupan a aquellas exopeptidasas capaces de separar residuos terminales cuyo grupo  $\alpha$ -N o  $\alpha$ -C no se encuentra libre porque está ciclado (por ejemplo: pGluAP), sustituido o unido a otros residuos terminales que formen enlace mediante un grupo C o N no unido a un carbono  $\alpha$  (por ejemplo:  $\gamma$ -GluAP).

Los nombres dados a la mayoría de las AP se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un residuo N-terminal característico. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces formados por Ala en el extremo N-terminal se denominaría AlaAP.

De manera similar, los nombres aplicados a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos individuales sirven para identificar el residuo C-terminal preferido o requerido por el enzima.

### 1.3. RESUMEN HISTÓRICO.

El estudio de los enzimas proteolíticos tuvo su origen a finales del siglo XIX en los laboratorios alemanes, cuando se descubrió que la composición química de los tejidos se alteraba tras su almacenamiento. Tales alteraciones se producían aun cuando se impedía la intervención bacteriana. Al describir la naturaleza de estos cambios, Jacoby (1900) introdujo el término autólisis para referirse al proceso de autodigestión de los tejidos, producido presumiblemente por efecto de distintas actividades enzimáticas. Pronto se descubrió (Hedin y Rowland, 1901) que la actividad proteolítica era mucho mayor a pH ácido en todos los tejidos excepto en el músculo esquelético, el cual manifestaba débil actividad a ambos lados de la neutralidad.

El término catepsina se propuso para describir peptidasas que actuaban preferentemente en medio ácido y que serían localizadas posteriormente en todas las células y tejidos, luego se trataba de peptidasas de origen lisosomal. Un punto crucial en el estudio de estos enzimas fue la introducción de la hemoglobina como sustrato para medir la actividad proteolítica (especialmente la catepsina D) que se utiliza

actualmente dada su facilidad de purificación y determinación (Ansoo, 1938). Además, se introdujeron sustratos sintéticos para su determinación, algunos de los utilizados fueron Z-Glu-Tyr (Z: benciloxycarbonil; Tyr: tirosina), Bz-Arg-NH<sub>2</sub> (Bz: benzoil; Arg: arginina) y Leu-NH<sub>2</sub> como sustratos de las catepsinas I, II y III respectivamente (Fruton *et al.*, 1941a,b). Esta última fue posteriormente reconocida como una AP y redenominada LeuAP. Además se descubrió la catepsina IV que describe la actividad hidrolítica sobre el sustrato Z-Gly-Phe (Phe: fenilalanina) y que finalmente ha sido identificada como una carboxipeptidasa.

En 1952, fueron clasificadas de nuevo las catepsinas por Tallan y colaboradores, creando términos que aún resultan familiares: catepsina A, B y C. Posteriormente se descubrió la catepsina D y E (Press *et al.*, 1960).

A partir de 1970, el número de enzimas proteolíticas descritos incrementó de forma abrumadora, siendo evidente que la nomenclatura enzimática se iba de las manos por no existir una autoridad que la guiara. En muchos casos el mismo enzima se conocía con nombres diferentes, mientras que a veces el mismo nombre era asignado a diferentes enzimas. Pero sus mecanismos catalíticos se encuadraron en uno de los previamente señalados.

A continuación se hace referencia al descubrimiento de las exopeptidasas exclusivamente, agrupándolas según su localización subcelular (citosólicas, de membrana y lisosomales).

Las exopeptidasas citosólicas se encuentran entre las primeras proteasas conocidas (McDonald y Barrett, 1986). La mucosa intestinal fue la fuente original del descubrimiento de muchas exopeptidasas, ya que contiene una mezcla compleja de enzimas de diversa especificidad y naturaleza. Entre ellas se encuentran la LeuAP, primer ejemplo de exopeptidasa N-terminal conocido (Linderstrom-Lang, 1929), y varias dipeptidasas. Simultáneamente (Waldschmidt-Leitz y Purr, 1929) se descubrió en páncreas de buey una carboxipeptidasa. Más tarde (Folk, 1956) se describió otra carboxipeptidasa pancreática que mostraba preferencia casi absoluta por aminoácidos básicos. Esta última se denomina actualmente carboxipeptidasa B, y la primera, carboxipeptidasa A. Ambas son segregadas como zimógenos (procarboxipeptidasas) que se activan por tripsina.

Tras las AP de origen intestinal, se encontró que el riñón era una fuente aún más abundante de estas actividades enzimáticas (Spackman *et al.*, 1955) al igual que el cristalino y la pulpa dental. Hopsu y colaboradores (1964) detectaron en los extractos de hígado de rata una nueva AP citosólica dependiente de Cl<sup>-</sup> y grupos -SH, que fue denominada AP-B (ArgAP) debido a su estricta especificidad por residuos

básicos; Parece ser la contrapartida de la carboxipeptidasa B. La denominada AlaAP soluble fue descubierta en hígado (Behal *et al.*, 1966), pero su especificidad de sustrato, contrastada con la APB, abarca la mayoría de residuos N-terminales de los péptidos, aunque la Ala sea el residuo preferido. Por otro lado, se identificó una nueva AP en riñón específica para los residuos Asp y Glu N-terminales (Cheung y Cushman, 1971), a la que mas tarde se le dio el nombre de AspAP (Wilk *et al.*, 1998).

Por otro lado, las membranas celulares contienen exopeptidasas de todo tipo, y la mayoría de ellas fueron inicialmente descritas a partir de extractos renales. La AP-A (GluAP) es relativamente específica para aminoácidos N-terminales acídicos con preferencia por hidrolizar enlaces peptídicos donde participa el Glu (Glenner *et al.*, 1962), a diferencia de su contrapartida citosólica que prefiere Asp.

La AP-M (AlaAP de membrana) (Pfleiderer y Celliers, 1963) sería la contrapartida de la AlaAP citosólica con un amplio rango de acción sobre enlaces donde participan aminoácidos neutros y básicos N-terminales.

Desde que se descubriera la capacidad del suero de mujeres embarazadas de degradar oxitocina, muchos investigadores estudiaron este enzima de membrana, que es una AP con especificidad por los enlaces peptídicos entre la Cys N-terminal y la Tyr adyacente de la oxitocina o vasopresina, por lo que se le llamó oxitocinasa o vasopresinasa (Sjöholm e Yman, 1967).

A nivel lisosomal se ha podido demostrar que algunas catepsinas B, D, H son realmente exopeptidasas y no endopeptidasas. Sólo se ha purificado una AP a este nivel (Krischke *et al.*, 1977), se trata de una Cys-proteinasa que, junto a su capacidad de hidrolizar proteínas, posee actividad AP. Por ello se le ha calificado de endoaminopeptidasa. Probablemente sea el enzima responsable de la actividad AP previamente insinuada por otros autores. Actualmente se le denomina catepsina H.

Por último, también se han encontrado representantes del grupo de las  $\Omega$ -peptidasas en las tres localizaciones subcelulares previamente reseñadas (citosol, membrana y lisosomas). Por ejemplo, la pGlu peptidasa II es un enzima unido a membrana, mientras que la pGlu peptidasa I se encuentra en el citosol (McDonald y Barrett, 1986).

#### **1.4. AMINOPEPTIDASAS.**

En los últimos años se ha producido una importante aceleración en las investigaciones sobre enzimas proteolíticos, desarrollándose varias aplicaciones prácticas en biotecnología que sugieren que las peptidasas son potenciales dianas

---

terapéuticas. El análisis de la secuencia completa de varios genomas ha mostrado que el 2% de todos los productos genéticos son peptidasas, lo que indica que se trata de uno de los grupos funcionales de proteínas más importante (Barrett *et al.*, 1998).

A continuación, siguiendo a Barrett y colaboradores (1998), se expone un breve resumen de algunas de las AP presentes en el organismo de los mamíferos y descritas en la literatura, junto a algunas características y propiedades de estas enzimas. Excepto para el enzima AspAP, cuya descripción corresponde a Wilk y colaboradores (1998) y TyrAP, que aunque todavía no se ha clasificado ha sido descrita como actividad enzimática por Hui y colaboradores (1998).

#### **1.4.1. Alanina Aminopeptidasa.**

Se han descrito dos actividades específicas que han sido denominadas, según su localización como, AlaAP soluble y AlaAP microsomal.

##### 1.4.1.1. Alanina aminopeptidasa soluble.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.010.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBM*: E.C. 3.4.11.14.

*Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Ala (en menor grado Leu, Arg, Phe, Tyr, metionina (Met)), de un amplio rango de péptidos, aminoacil- $\beta$ -naftilamidas y aminoacil-metilumarinas.

*Sustrato artificial.* Ala- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades moleculares.* Es una zinc-sialoglicoproteína de 100 KDa, con un ión  $Zn^{2+}$  unido a su única cadena proteica. Extremadamente sensible a la puromicina, también se inhibe por EDTA y 1,10-fenantrolina. Mientras que es activada por compuestos -SH,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . pH óptimo de 7.5.

*Distribución.* Ampliamente distribuido por diferentes especies animales, especialmente tejidos de mamíferos y fluidos corporales.

*Aspectos biológicos.* La función fisiológica todavía no está bien conocida. La localización predominantemente citosólica no fundamenta el papel que también desarrolla en la degradación extracelular de péptidos bioactivos. Aunque exista en una amplia variedad de tejidos, la mayor parte del

trabajo se ha realizado con enzimas cerebrales, ya que ha sido implicado en el metabolismo de las encefalinas. Pero su amplia distribución muestra que no tiene puramente un efecto regulador de los neuropéptidos, por lo que se sugiere que participa en procesos proteolíticos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular.

1.4.1.2. Alanina aminopeptidasa microsomal.

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.001.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB*: E.C. 3.4.11.2.

*Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, preferiblemente Ala, aunque pueden ser muchos aminoácidos como Phe, Tyr, Leu y otros en menor grado, de péptidos, aminoacil- $\beta$ -naftilamidas, aminoacil- $p$ -nitroanilidas y aminoacil-metilcumarinas. Cuando un residuo terminal va seguido de Pro, los dos pueden ser liberados como un dipéptido.

*Sustrato artificial.* Ala- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades moleculares.* Es una metaloenzima altamente glicosilada por carbohidratos (20%). En su estado nativo existe como homodímero de 140-150 KDa en muchas especies, aunque se ha descrito como monomérica en el conejo. La cadena polipeptídica intacta ( $\alpha$ ) es susceptible de sufrir proteólisis generando dos fragmentos  $\beta$  y  $\gamma$ , de 90 y 45 KDa respectivamente, con un átomo de  $Zn^{2+}$  por subunidad. No se activa por iones de metales pesados y se inhibe por agentes quelantes, bestatina, amastatina, probestina y últimamente 3-amino-2-tetralona. Su pH óptimo está alrededor de 7, y al aumentar la concentración de sustrato puede llegar a 9.

*Distribución.* Es una proteína de membrana integral de tipo II, localizada en la membrana plasmática como una ectoenzima, muy distribuida entre diferentes especies y tejidos, con mayor abundancia en las membranas del borde en cepillo de hígado, riñón, intestino delgado, con funciones típicas de estos lugares, y en cerebro.

*Aspectos biológicos.* La presencia de este enzima en el cerebro ha sido muy estudiada debido a su potencial implicación en la hidrólisis e inactivación de las

acciones de ciertos neuropéptidos, especialmente de encefalinas, de la sustancia P y la interleukina 8. Además está presente en células endoteliales y membranas sinápticas de varios tipos de células nerviosas, con funciones relacionadas con cada tipo celular. También actúa en el catabolismo del glutatión, para la reabsorción de aminoácidos. Es idéntica al antígeno CD13 expresado en la superficie de células hematopoyéticas y receptor de ciertos virus como coronavirus.

#### **1.4.2. Arginina Aminopeptidasa.**

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.014.

- *Clasificación enzimática del NC-UIMB*: E.C. 3.4.11.6.

*Acción.* Libera residuos básicos (Arg, lisina (Lys)) N-terminales de L-aminoacil- $\beta$ -naftilamidas, L-aminoacil-4-metilcumarinas y de varios péptidos como las encefalinas, somatostatina y kalidina 10 (que se convierte en bradikinina).

*Sustrato artificial.* Arg- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades moleculares.* Es una zinc-metalopeptidasa de 72,3 KDa con un átomo de  $Zn^{2+}$  unido a su única cadena proteica. Se inhibe por agentes quelantes (EDTA, EGTA (ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-tetraacético) y 1,10-fenantrolina) y por inhibidores clásicos como la bestatina y amastatina. Se activa por  $Cl^-$  a concentraciones fisiológicas y bajas concentraciones de compuestos -SH. Su pH óptimo es 7.

*Distribución.* Es un enzima de membrana o soluble, ampliamente distribuido en diferentes tejidos de mamíferos y varias líneas celulares, aunque su presencia es importante en las espermátidas en la fase de maduración.

*Aspectos biológicos.* Su ubicuidad argumenta en favor de su adaptabilidad en varios subcompartimentos celulares y su implicación en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos, incluyendo procesos inflamatorios en los que algunos sustratos potenciales de esta enzima (encefalinas, kalidina10 o somatostatina) pueden jugar un papel importante.

**1.4.3. Cisteína Aminopeptidasa.**

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.011.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB*: E.C. 3.4.11.3.

*Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, Cys de sustratos como la oxitocina y vasopresina, además de hidrolizar L-Cys-di-naftilamida, aminoacil- $\beta$ -naftilamidas y aminoacil- $p$ -nitroanilidas.

*Sustrato artificial.* Cys- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades moleculares.* Es una glicoproteína en forma dimérica, y cada subunidad contiene dos átomos de  $Zn^{2+}$ . Dependiendo del método de purificación es de 14, 17 o 21 KDa. Se inhibe por agentes quelantes (1,10-fenantrolina), inhibidores clásicos (bestatina y amastatina) y por cationes divalentes ( $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ). pH óptimo 7.4.

*Distribución.* Abunda en plasma de embarazadas y placenta de primates y humanos. También en el hipotálamo, existiendo trazas en suero de mujeres no embarazadas y hombres, aunque estudios con Northern Blot muestran que existe en otros tejidos (corazón, músculo esquelético, cerebro).

*Aspectos biológicos.* Es un ectoenzima que degrada vasopresina y oxitocina, por lo que se llama también oxitocinasa. Durante el embarazo, la placenta libera esta oxitocinasa a la circulación materna (mediante un mecanismo desconocido). La actividad enzimática permanece en suero a bajas concentraciones en el primer trimestre y aumentan progresivamente durante el segundo y tercer trimestre hasta llegar al máximo en el momento del parto. La oxitocinasa en sangre sirve como control de la presión sanguínea materna y del feto mediante la regulación de la concentración de péptidos vasoactivos. También sugiere que el enzima puede estar implicado en el crecimiento fetal mediante la degradación de somatostatina.

**1.4.4. Aspartato Aminopeptidasa.**

- *Clasificación de peptidasas*: Clan MH, familia M18, MEROPS ID: M18.002.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB*: E.C. 3.4.11.21.

---

- Acción.* Libera un aminoácido N-terminal ácido de péptidos (Glu, Asp), con preferencia por el Asp, y aminoacil- $\beta$ -naftilamidas aunque con menor eficacia.
- Sustrato artificial.* Asp- $\beta$ -naftilamida.
- Propiedades moleculares.* Es una metalopeptidasa de 440 KDa sensible a agentes quelantes como el DTT e iones  $Zn^{2+}$ . pH óptimo en el rango neutro (7.5).
- Distribución.* Es un enzima que tiene una distribución uniforme en diferentes tejidos y especies, aunque la mayor actividad se encuentra a nivel de los testículos. Es un abundante enzima citosólico en células de mamíferos.
- Aspectos biológicos.* Debido a su distribución uniforme en todos los tejidos y su abundancia en el citosol, se sugiere que tiene un papel importante en el metabolismo general de péptidos y proteínas intracelulares. Un papel mas especializado en tejidos específicos puede ser el metabolismo de péptidos biológicamente activos como la angiotensina II (Ang II).

#### **1.4.5. Glutamato Aminopeptidasa.**

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.003.
- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.7.

- Acción.* Libera restos Glu N-terminales y también, aunque en menor medida, restos Asp de péptidos,  $\alpha$ -(L)-aminoacil- $\beta$ -naftilamidas y  $\alpha$ -(L)-aminoacil- $p$ -nitroanilidas.
- Sustrato artificial.*  $\alpha$ -(L)-Glu- $\beta$ -naftilamida.
- Propiedades moleculares.* Es una zinc-metalopeptidasa de 45-400 KDa (depende del método de purificación y/o del tejido). Sensible a agentes quelantes (EDTA, EGTA, 1,10-fenantrolina), amastatina e iones de metales de

transición ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ). Se activa por  $Ca^{2+}$ . pH óptimo 7.2.

*Distribución.* Es un enzima con distribución uniforme por diferentes tejidos, aunque principalmente se encuentra en cerebro y digestivo.

*Aspectos biológicos.*

Proteína integral de membrana de tipo II, de la que es bien conocido uno de sus sustratos fisiológicos, la Ang II (importante en la regulación de la presión sanguínea). Por esta razón se la ha llamado angiotensinasa, encargada de transformar la Ang II en Ang III (angiotensina III; uno de los neuropéptidos más activos en el cerebro), mediando así los efectos del sistema renina-angiotensina (SRA) en el cerebro y la homeostasis de la presión sanguínea. Aunque este enzima se expresa en muchos tejidos, su expresión es específica de línea celular y la diferenciación es específica del estado de las células hematopoyéticas. También se sugiere que este ectoenzima puede estar implicado en la regulación de la proliferación de las células pre-B.

#### **1.4.6. Piroglutamato Aminopeptidasa.**

Existen dos actividades específicas y diferenciadas de pGluAP según la localización, la actividad pGluAP I, localizada a nivel citosólico, y la actividad pGluAP II, localizada a nivel de membrana (también llamadas pGlu-peptidasas I y II).

##### **1.4.6.1. Piroglutamato aminopeptidasa I.**

- *Clasificación de peptidasas:* Clan CF, familia C15, MEROPS ID: C15.010.

- *Clasificación enzimática del NC-UIMB:* E.C. 3.4.19.3.

*Acción.* Libera un grupo pGlu N-terminal de péptidos y proteínas, no siendo el segundo aminoácido Pro, además de aminoacil- $\beta$ -naftilamidas, aminoacil-metilcumarinas y aminoacil-p-nitroanilidas.

*Sustrato artificial.*

pGlu- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades moleculares.*

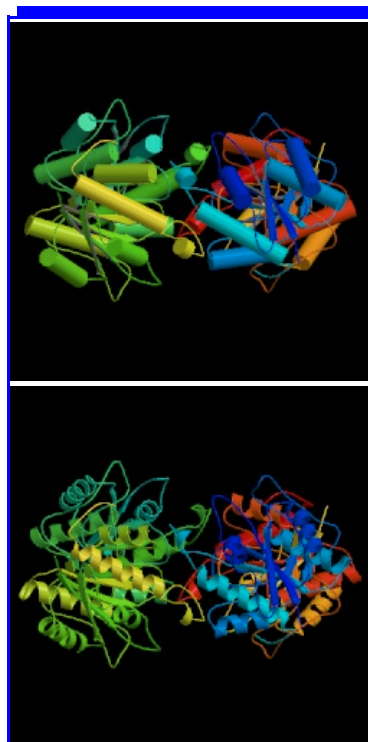
Cistein-peptidasa monomérica de 24 KDa. Es un enzima sulfidril-dependiente, mostrando un requerimiento estricto de agentes como el DTT o 2-mercaptoetanol (2-ME). Se inhibe por iodoacetamida y

---

otros agentes bloqueantes de grupos sulfidrilos. También es muy sensible a trazas de metales pesados. Tiene dos residuos de Cys, uno de los cuales está implicado en su actividad catalítica (*figura I.1.2*). pH óptimo entre 6.5-8.5.

*Distribución.* Exopeptidasa ampliamente distribuida por diferentes especies y tejidos a nivel citosólico, especialmente en cerebro y digestivo.

*Aspectos biológicos.* Capaz de liberar residuos pGlu N-terminales de péptidos activos biológicamente, incluyendo la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), neurotensina y bombesina. Aunque su papel no está claro todavía, por similitud a otras AP solubles, puede contribuir a los estados funcionales del catabolismo intracelular de péptidos y aminoácidos libres.



**Figura I.1.2.** Estructura tridimensional propuesta para el enzima pGluAP I.

#### 1.4.6.2. Piroglutamato aminopeptidasa II.

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MA, familia M1, MEROPS ID: M01.008.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.19.6.

*Acción.* Libera el grupo pGlu N-terminal de tripéptidos pGlu-His-X y tetrapéptidos pGlu-His-X-Gly (His: histidina), con estrecha especificidad por sustratos como la TRH, además de las Glu-His-Pro- $\beta$ -naftilamidas.

*Sustrato artificial.* pGlu- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades*

*moleculares.* Metalopeptidasa glicosilada, zinc-dependiente de alto peso molecular (230 KDa) formada por dos subunidades. Se inhibe por 1,10-fenantrolina y agentes quelantes como el EDTA. pH óptimo de 7.3.

*Distribución.* Ectoenzima localizada concretamente como proteína integral de membrana en la superficie de células neuronales (no células gliales), aunque también se encuentra en todo el sistema nervioso central (SNC), retina y pulmón.

*Aspectos*

*biológicos.* La alta especificidad por su sustrato TRH indica que este enzima puede servir para funciones muy especializadas. Su localización en cerebro, en las células neuronales sugiere que puede ser importante para la terminación y transmisión de señales de TRH, un neuromodulador o neurotransmisor del SNC.

**1.4.7. Leucina Aminopeptidasa.**

- *Clasificación de peptidasas:* Clan MF, familia M17, MEROPS ID: M17.001.

- *Clasificación enzimática del NC-UIBMB:* E.C. 3.4.11.1.

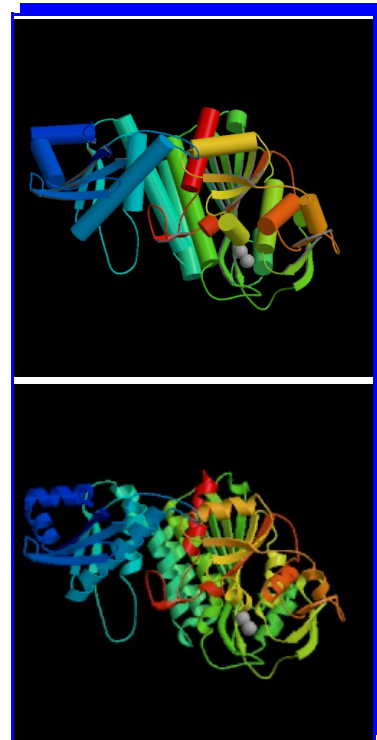
*Acción.* Libera un aminoácido N-terminal, preferentemente Leu pero pueden ser otros aminoácidos, incluyendo Pro aunque en menor medida, de péptidos, aminoacil- $\beta$ -naftilamidas y aminoacil- $p$ -nitroanilidas.

*Sustrato*

*artificial.* Leu- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades*

*moleculares.* Metalopeptidasa monomérica de 324 KDa. Se inhibe por amastatina y bestatina. Se activa por iones de metales pesados ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ). El sitio activo tiene dos  $Zn^{2+}$  (Figura I.1.3.). pH óptimo de 9-9.5.



**Figura I.1.3.** Estructura tridimensional propuesta para el enzima LeuAP.

*Distribución.* Enzima ampliamente distribuida y localizada en células de animales, plantas y bacterias.

*Aspectos*

*biológicos.* La función precisa en animales todavía no es bien conocida, aunque parece actuar en la degradación de oligopéptidos, incluyendo péptidos hormonales. La actividad LeuAP alterada se ha asociado a ciertas condiciones patológicas como las cataratas en humanos. Los cambios en los niveles de este enzima se han usado para la diagnosis prenatal de la fibrosis cística.

#### **1.4.8. Tirosina Aminopeptidasa.**

*Acción.* Libera un resto Tyr N-terminal de las Met-enkefalinas e hidroliza aminoacil- $\beta$ -naftilamidas de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas, polares no cargadas, cargadas positivamente o aromáticas.

*Sustrato*

*artificial.* Tyr- $\beta$ -naftilamida.

*Propiedades*

*moleculares.* Cistein-peptidasa dependiente de grupos -SH de una sola cadena polipeptídica de 110 KDa. Se inhibe con agentes quelantes (EDTA, 1,10-fenantrolina) y es muy sensible a la inhibición por amastatina y puomicina, también a los metales divalentes como  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ . Sin embargo,  $Mg^{2+}$  lo restaura y el DTT es necesario para mantener la actividad enzimática. pH óptimo de 7.

*Distribución.* Distribución heterogénea, ha sido descrito exclusivamente en neuronas del SNC de cerebro de ratas (corteza e hipocampo), no en tejidos periféricos. Abundante en sinaptosomas. Un 85% se ha encontrado en forma soluble y el 15% restante asociado a membranas.

*Aspectos*

*biológicos.* Su enriquecimiento en sinaptosomas y terminaciones nerviosas sugiere que juega un papel importante en la neurotransmisión y diferenciación sináptica. Degrada enkefalinas.

### 1.5. AMINOPEPTIDASAS CEREBRALES.

La primera AP conocida y caracterizada en el SNC fue la LeuAP (EC 3.4.11.1). En 1963, Brecher comunicó por primera vez la existencia de este enzima en la fracción soluble, mitocondrial y microsomal de cerebro de buey, demostrando su capacidad para hidrolizar los sustratos Leu-, Tyr- y Phe-NH<sub>2</sub>. Pero no fue hasta unas décadas después, cuando se estudiaron las propiedades de este enzima purificado a partir de cerebro humano (Gibson *et al.*, 1991). En el proceso de purificación se consiguió separar completamente su actividad de la de AlaAP soluble, demostrándose su pH óptimo de 9.5 y su requerimiento de Mg<sup>2+</sup> para obtener la máxima eficacia. El enzima es muy activo sobre las encefalinas, pero poco activo frente a sustratos sintéticos del tipo de las aminoacil-7-amido-4-metil-cumarinas. Sin embargo, hay otros péptidos biológicos poco hidrolizables (colecistoquinina, Ang) o nada en absoluto (somatostatina, vasopresina). Como sucede en otros tejidos, se inhibe por bestatina y amastatina, pero no por puromicina.

Por lo tanto la LeuAP presenta propiedades similares a las detectadas en otras localizaciones y debería tenerse en cuenta como posible inactivador fisiológico de éstos péptidos por su capacidad de hidrolizar encefalinas. No obstante, la AlaAP posee mayor actividad sobre estos sustratos. Ambos enzimas, de localización citosólica, se consideran con pocas posibilidades de acceder a los neuropéptidos sinápticamente liberados y, a no ser que exista un proceso de recaptación peptídica, su importancia fisiológica está aún poco clara.

La actividad enzimática de AlaAP soluble (EC 3.4.11.14) en SNC y Sistema Nervioso Periférico (SNP) fue detectada por Adams y Glenner (1962) en ratas, utilizando como sustratos aminoacil-β-naftilamidas (Leu-, Ala- y Phe-β-naftilamida). Dicha actividad, determinada colorimétricamente, se obtuvo a partir del sobrenadante de homogenizados centrifugados a 700 g del lóbulo frontal, cuerpo caloso, nervio ciático y nervio óptico de cerebro de rata. La hidrólisis de las aminoacil-β-naftilamidas correspondían a AP distintas de la LeuAP detectada en riñón, utilizando como sustratos dipéptidos y leucinamida, y a su vez distinta de la catepsina C detectada en bazo. Debido a sus propiedades, resulta ser la primera descripción en SNC de la actividad que hoy se conoce como AlaAP soluble.

Durante la misma década, otros grupos de investigadores estudiaron las propiedades y localización de este enzima en el SNC. Ellis y Perry (Ellis, 1963; Ellis y Perry, 1966) centraron su estudio en la hipófisis de cerebro bovino determinando la actividad AP en la fracción soluble con distintas aminoacil-β-naftilamidas. Confirmaron que el enzima se activa por compuestos tiólicos tales como el 2-ME, el cual sirve para su conservación y reactivación, y que tal actividad se manifestaba también en otros tejidos. Además, describieron en hipófisis otra actividad AP que

---

denominaron ArgAP, específica para los aminoácidos Arg y Lys (posteriormente conocida también como APB). La primera requería compuestos tiólicos para su activación, se inhibía por puromicina y mostraba actividad hidrolítica para otros aminoácidos básicos y neutros. Posteriormente se conoció como AlaAP soluble.

Además de su requerimiento de grupos -SH en estado reducido para su completa actividad, estas enzimas necesitaban la presencia de un metal en estado iónico tal como zinc, cobalto o manganeso, puesto que los agentes quelantes como el EDTA ocasionaban pérdida de su actividad.

El grupo de investigadores encabezados por Marks (Marks *et al.*, 1968a) realizaron una serie de estudios de estas enzimas en SNC. A partir de homogeneizados de cerebro de rata (presumiblemente fracción soluble) purificaron parcialmente con DEAE-celulosa (di-etil-amino-etil-celulosa) tres picos distintos de actividad AP. El primero de ellos resultaba específicamente sensible hacia el tripéptido Leu-Gly-Gly, y no hidrolizaba las aminoacil- $\beta$ -naftilamidas (LeuAP). El segundo era específico para aminoácidos Arg y Lys (APB). Y el tercero era activo tanto con aminoácidos básicos como neutros (AlaAP). Solamente se encontraron actividades muy pequeñas para aminoácidos ácidos. Tanto el segundo como el tercer pico requerían compuestos tiólicos y eran inhibidos por puromicina, pero sus cinéticas enzimáticas y pH óptimos eran diferentes entre sí y diferentes de la típica LeuAP de riñón, no sensible a la puromicina.

Estos mismos autores demostraron también que la actividad AP se encontraba predominantemente a nivel soluble, aunque podía detectarse también en núcleo, mitocondrias y membranas, pero no a nivel ribosomal. Una concentración especialmente alta fue observada a nivel de las terminales nerviosas, lo que hizo sugerir a los autores la posible participación de estas enzimas en el metabolismo de péptidos o proteínas involucradas en la función sináptica (Marks *et al.*, 1968b).

Un nuevo estudio sobre la distribución subcelular de AlaAP se llevó a cabo por Beck y colaboradores (1968) en médula espinal de rata, confirmando el predominio de este enzima a nivel soluble y su presencia en otras fracciones aunque en menor proporción. Encuentran, además, que una parte considerable de la actividad enzimática se localiza en la mielina. Por un estudio electroforético en gel de poliacrilamida, utilizando siempre Ala- $\beta$ -naftilamida como sustrato, consiguieron separar la actividad enzimática en dos bandas en todas las fracciones subcelulares, incluida la fracción soluble.

La AlaAP soluble también ha sido estudiada en cerebro de primate. Brecher y Suszkiw (Brecher y Suszkiw, 1969; Suszkiw y Brecher, 1970) purificaron en la

fracción soluble de cerebro de mono un enzima que era capaz de hidrolizar aminoacil- $\beta$ -naftilamidas de aminoácidos neutros y básicos, con poca actividad para aminoácidos ácidos. El enzima no mostraba actividad dipeptidásica, tripeptidásica o amidásica y era inhibido por puromicina. Sin embargo, a diferencia de Marks y colaboradores (1968a), no pudieron demostrar la existencia de isoenzimas en su preparación. Posteriormente se purificó nuevamente la AlaAP soluble en cerebro de mono (Hayashi y Oshima, 1977; Hayashi, 1978) que mostraba resultados coherentes con los previamente conocidos. El enzima se inhibía con puromicina y EDTA, no poseía actividad endopeptidásica, se estimulaba por DTT y se inhibía por bestatina reversiblemente. Los péptidos tales como LHRH y TRH (con pGlu en sus extremos N-terminales), la sustancia P y la bradikinina (cuyos aminoácidos N-terminales son Pro), no resultaban afectados por el enzima. Sin embargo, péptidos con aminoácidos N-terminales neutros como las encefalinas, resultaban rápidamente hidrolizados. Asimismo, y sorprendentemente, la preparación hidrolizaba secuencialmente Ang I y II, cuyos aminoácidos N-terminales son Asp.

Un nuevo impulso al estudio de las AP y otros enzimas proteolíticos se produjo tras el descubrimiento de los péptidos opiáceos, particularmente los pentapéptidos Met- y Leu-encefalina. El hecho de que estas sustancias mostrasen un efecto analgésico de muy corta duración dirigió las investigaciones hacia los enzimas que las degradan. En 1976, Hambrook y colaboradores, demostraron que la exposición de las encefalinas a homogeneizados cerebrales producía una rápida hidrólisis del primer enlace del extremo N-terminal (Tyr-Gly). Posteriormente se estudió la localización subcelular de esta actividad hidrolítica en cerebro de rata, detectándose gran actividad en la fracción soluble comparado con el resto de las fracciones estudiadas, así como una apreciable actividad a nivel sinaptosomal, aunque menor que la anterior, considerada compatible con el hipotético papel neurotransmisor de las encefalinas. Un elevado número de trabajos de investigación confirmó posteriormente la degradación de las encefalinas por efecto de AP solubles procedentes de distintos tejidos (Austen *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1977; Marks *et al.*, 1977; Vogel y Alstein, 1977; Schnebli *et al.*, 1979) así como la capacidad de los extractos de membrana cerebrales de degradar también las encefalinas por su extremo N-terminal (Miller *et al.*, 1977).

El estudio de las AP en general y de la AlaAP en particular, se hace cada vez más complejo y diversificado debido probablemente a la introducción de nuevas técnicas de determinación de estas sustancias y al descubrimiento de un número cada vez mayor de péptidos cerebrales con probable función neurotransmisora o neuromoduladora. Así, por ejemplo, Shaw y Cook (1979) desarrollaron un método histoquímico para la localización de AP en el SNC basado en la visualización microscópica de la hidrólisis de aminoacil- $\beta$ -naftilamidas mediante acoplamiento de

---

la  $\beta$ -naftilamida a un colorante. Los autores mostraron una distribución no uniforme de la actividad enzimática que se concentraba especialmente en distintos tipos neuronales, así como en las paredes vasculares. Esta desigual distribución de AP en el SNC ha sido confirmada mediante métodos bioquímicos (Alba *et al.*, 1993).

Experimentos posteriores contribuyen a crear una situación cada vez más compleja con relación al proceso de inactivación de los neuropéptidos. En 1980, Guyon y colaboradores, utilizaron una técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta presión) para separar los fragmentos de las encefalinas, describiendo la existencia conjunta de actividad AP soluble (atribuible a AlaAP) y unida a membrana que a partir de entonces se conoció como “encefalinasa” y que actualmente se ha identificado con la previamente conocida como endopeptidasa 24.11. (Hersh, 1986). Las referencias de que una AP no unida a membrana y sensible a puomicina podía hidrolizar Leu- y Met-encefalina en cerebro de rata, fueron confirmadas posteriormente por diversos autores (Schnebli *et al.*, 1979; Barclay y Phillipps, 1980; Vogel y Altstein, 1980; Wagner *et al.*, 1981). Tal AP posee propiedades que la identifican como AlaAP soluble. Dicha actividad es distinta y separable de la detectada a nivel de las membranas, incluida la membrana sinaptosomal (Vogel y Altstein, 1980), circunstancia que ha dado origen a una controversia sobre qué enzima es responsable de la degradación fisiológica de las encefalinas presumiblemente liberadas en la terminal sináptica.

La AlaAP soluble no sólo tiene capacidad para hidrolizar las encefalinas, sino que también es capaz de degradar otros neuropéptidos, tanto opiáceos como no opiáceos. Ya en 1980, Hersh y colaboradores demostraron que los homogeneizados de cerebro de rata tenían actividad AP capaz de hidrolizar, además de las encefalinas, las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -endorfinas, liberando la Tyr N-terminal común de los tres péptidos. Estos mismos autores purificaron posteriormente la AlaAP soluble en cerebro bovino y la identificaron, por sus propiedades, como las previamente descritas en otros laboratorios (Hersh y McKelvy, 1981). Asimismo, la capacidad de este enzima para degradar distintas dinorfinas (familia de neuropéptidos que comienzan por la secuencia del pentapéptido Leu-encefalina) ha sido puesta de manifiesto por Berg y Marks (1984) en cerebro de rata. Otros péptidos que pueden ser degradados por AlaAP soluble son las kininas 10 y 11 para rendir kinina 9 (bradikinina) (Camargo *et al.*, 1972; Martins *et al.*, 1980).

Con relación al número de AP capaces de hidrolizar a las encefalinas, un trabajo parcialmente clarificador fue llevado a cabo por Hui y colaboradores (1988) en cerebro de rata, donde se purificaron simultáneamente actividades de AP solubles y unidas a membrana, pudiendo caracterizar al menos cuatro enzimas distintos (SI, SII, MI, MII). SI y SII, además de degradar a las encefalinas, hidrolizan el sustrato

Arg- $\beta$ -naftilamida. SII también hidroliza Ala- $\beta$ -naftilamida, por lo que en principio podría ser análogo a la AlaAP soluble, mientras SI resulta similar a la APB. Existen, sin embargo, discrepancias en cuanto al efecto de los inhibidores. Las AP de membrana se discutirán posteriormente.

La AlaAP ha sido purificada (Gibson *et al.*, 1989) a partir de corteza cerebral de humanos, y se ha corroborado su capacidad para hidrolizar encefalinas y péptidos relacionados. Aunque generalmente se asume que la inactivación de los neuropéptidos está mediada por peptidasas unidas a membrana, existen otras alternativas adicionales que estos autores resaltan en su trabajo y que plantean la posibilidad de que las peptidasas citosólicas tengan un papel en la degradación de estos péptidos: en primer lugar, los neuropéptidos pueden ser internalizados como parte del complejo péptido-receptor, como se ha demostrado para algunas hormonas peptídicas; por otra parte, existe la posibilidad de que las peptidasas solubles puedan ser liberadas en el espacio extracelular.

La primera referencia sobre la existencia de una AP específica para aminoácidos básicos en el SNC (ArgAP soluble: EC 3.4.11.6), fue proporcionada por Ellis y Perry (1966) en hipófisis bovina. Independientemente, se purificó una AP en la fracción citosólica del cerebro de rata que mostraba alta actividad por las aminoacil- $\beta$ -naftilamidas con aminoácidos básicos, y aunque también se mostró sensible a aminoácidos neutros, no fue así en presencia de aminoácidos ácidos (Schnebli *et al.* 1979). Según estos autores, las propiedades del enzima diferían de las AP cerebrales previamente conocidas, aunque no comparan dicho enzima con el descrito por Ellis y Perry (1966) en hipófisis bovina.

La actividad de este enzima ha sido especialmente estudiada en relación a su posible participación en el metabolismo del SRA cerebral. Para ello han sido de gran importancia el uso de inhibidores de los enzimas implicados en este sistema. Concretamente, la sustancia denominada bestatina (Umezawa *et al.*, 1976) se ha utilizado como inhibidor de la APB, que parece corresponderse con la Arg soluble. Wright y colaboradores (1985b) inyectaron bestatina intracerebroventricularmente a ratas hipertensas y ratas normales junto con Ang II y III, demostrando que el pretratamiento con éste inhibidor potenciaba y prolongaba el aumento de la presión arterial producida por la Ang III en ratas hipertensas. Los autores sugirieron que estas ratas podrían tener una deficiencia de actividad AP a nivel central que permitiera a las Ang endógenas permanecer en forma activa durante mas tiempo del normal, circunstancia que justificaría la existencia de hipertensión.

Tanto la bestatina como la amastatina (Aoyagi *et al.*, 1984) parecen no producir efecto alguno en el cerebro (Felix y Harding, 1986) al aplicarse

---

ionofóricamente en el mismo, registrándose la actividad eléctrica en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Tales neuronas son mucho más sensibles a la Ang III que a la Ang II, y ambas actividades se potencian dramáticamente cuando simultáneamente se suministra bestatina (inhibidor de la APB). Por otro lado, la amastatina reduce o bloquea los efectos estimulatorios de la Ang II a este nivel. Debe tenerse en cuenta que la APB tiene capacidad para hidrolizar a la Ang III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe; donde Val: valina; Ile: isoleucina) y que la Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) es susceptible de ser hidrolizada por la APA.

Tanto la Ang II como la III tienen actividad dipsogénica e hipertensora cuando se administran de forma intracerebroventricular. La bestatina, administrada por esta vía, induce un incremento considerable del consumo de agua en ratas, y esto no lo produce la amastatina (Wright *et al.*, 1988). Por tanto, la bestatina induce un incremento de la vida media de la Ang III impidiendo su inactivación por parte de la APB. Como la bestatina incrementa la respuesta presora de la Ang III, mientras que la amastatina suprime la respuesta presora de la Ang II (Sullivan *et al.*, 1988), se ha llegado a la conclusión de que la Ang II debe ser convertida en Ang III para que sea activa en el cerebro, y esta última es inactivada por la APB.

La ArgAP soluble ha sido purificada en cerebro humano post mortem y resuelta en dos isoenzimas estrechamente relacionados activados por Cl<sup>-</sup> (McDermott *et al.*, 1988). Curiosamente, ambos poseen actividad endopeptidásica capaz de hidrolizar varios péptidos biológicamente activos, entre los que se encuentran la neurotensina, bradiquinina, Ang I, sustancia P, LHRH y somatostatina. Sin embargo, la actividad endopeptidásica no se estimula por Cl<sup>-</sup> ni se inhibe por bestatina.

Las AP unidas a membrana detectadas en cerebro y otros tejidos han sido siempre inferiores a las altas actividades medidas a nivel citosólico. Pero dichas actividades han merecido especial atención por parte de los investigadores, sobre todo a nivel de SNC, puesto que por su localización son candidatas a participar en el proceso de degradación de los neurotransmisores liberados al espacio extracelular. En 1977, Miller y colaboradores, utilizando una preparación de membranas de cerebro de rata, demostraron que la degradación de las encefalinas se realiza primordialmente por una AP, al parecer presente en extractos crudos de estas membranas. Tales resultados han sido confirmados posteriormente en numerosas ocasiones. En este sentido, resulta curioso que la lipotropina 61-91, cuya secuencia N-terminal se corresponde con el pentapéptido Met-encefalina, es resistente a la ruptura por la AP de membrana del cerebro de rata (Austen y Smyth, 1977). Los autores atribuyen este fenómeno al hecho de que este péptido y otros similares, en cuanto a longitud, poseen propiedades conformacionales que protegen el extremo N-terminal de la degradación enzimática. Tal fenómeno, junto con otro parecido que

afecta al extremo C-terminal, aporta una explicación para la larga duración del efecto analgésico de los fragmentos largos similares a la lipotropina, comparado con los efectos de corta duración de los péptidos más pequeños de la misma familia.

La degradación de las encefalinas por AP de membrana parece estar acoplada a la interacción de estas sustancias con su receptor, lo que acelera su velocidad de degradación (Knight y Klee, 1978). De este modo, la unión al receptor opiáceo podría servir como un mecanismo de concentración que asegurara la eficiente inactivación de las encefalinas por medio de una peptidasa situada en su vecindad. Dicha actividad enzimática es inhibida potentemente por puromicina.

Hacia 1980 se conoció que la degradación de las encefalinas era llevada a cabo por una AP predominantemente citosólica y por una endopeptidasa unida a membrana, y que constituía el más firme candidato a la consideración de inactivador de estos péptidos, si se considera que son liberados al espacio intersináptico como mensajeros intercelulares (Sullivan *et al.*, 1980). Sin embargo, durante ese mismo año se descubre que la inactivación de las encefalinas se puede llevar a cabo por tres enzimas diferentes unidos a membrana (Gorenstein y Snyder, 1980): una AP, una dipeptidil-carboxipeptidasa (encefalinas A) y una dipeptidil-AP (encefalinas B). La contribución de cada uno de ellos a la inactivación fisiológica de las encefalinas era desconocida.

Durante esta década, la actividad AP unida a membrana estuvo sometida a un estudio exhaustivo (que continúa) cuyos resultados parecen concluir que a nivel de membrana existen varios enzimas con actividad AP. Algunos de estos estudios sobre esta cuestión son los siguientes:

En 1981, Hersh y McKelvy separaron en cerebro de rata dos AP (APMI y APMII), unidas a membrana capaces de hidrolizar Met-encefalina. APMI y APMII pueden ser distinguidas porque la primera hidroliza Arg- $\beta$ -naftilamida diecisiete veces más rápido que Ala- $\beta$ -naftilamida, mientras que la segunda muestra mayor afinidad por las aminoacil- $\beta$ -naftilamidas en general, pudiendo hidrolizar naftilamidas de aminoácidos básicos y neutros, es decir, muestra menor especificidad por la naturaleza del aminoácido sustituyente. Tal patrón de actividad también ha sido descrito para AP solubles y los resultados han sido confirmados posteriormente por el mismo autor (Hersh, 1985). En este último estudio se examina la distribución regional de ambas AP, llegándose a la conclusión de que APMII, que hidroliza a las encefalinas, se distribuye de manera parecida a la de los receptores opiáceos. También la APMII ha sido purificada en cerebro de mono (Shimamura *et al.*, 1983) y rata (Hui *et al.*, 1983b; Ulrich y Hersh, 1985), demostrándose que se inhibe por puromicina, bestatina y amastatina (Hui *et al.*, 1983a).

Además, se ha purificado otra AP de membrana en cerebro de rata que muestra la interesante propiedad de coeluir con el receptor para los opiáceos (Hui *et al.*, 1985). Los autores propugnan que ésta es una AP distinta de las previamente conocidas, aunque estos resultados necesitan una nueva confirmación.

A raíz de los trabajos realizados por Gros y colaboradores (1985a), surge la posibilidad de la existencia de una tercera AP asociada a las membranas celulares del SNC. Estos autores separaron dos AP unidas a membrana en el cerebro de rata, una se inhibía por puomicina y la otra no. Esta segunda fue identificada como la APM (EC 3.4.11.2) descrita en otros tejidos. Ambas actividades, sin embargo, son inhibidas por bestatina y son capaces de hidrolizar encefalinas. En un trabajo posterior (Gros *et al.*, 1985b), se resaltó la similitud existente entre la APM cerebral y la APMI de Hersh y McKelvy (1981), aunque las constantes cinéticas de ambas enzimas fuesen diferentes. Del mismo modo, se intentó identificar la actividad AP de membrana restante (más sensible a puomicina) con la APMII de Hersh. Estudios posteriores (Gros *et al.*, 1985b) han aportado más detalles sobre la localización precisa de este enzima. En primer lugar (Bausback y Ward, 1986), la APM se identificó como un enzima vascular unido a membranas del músculo liso y células endoteliales de vasos periféricos. Posteriormente esta misma actividad se detectó y purificó a nivel de los vasos de la microcirculación cerebral (Churchill *et al.*, 1987) y, finalmente, mediante técnicas de inmunización histoquímica (Hersh *et al.*, 1987), se llegó a la conclusión de que el enzima se encontraba localizado exclusivamente a nivel de los vasos sanguíneos de todos los tejidos examinados, incluyendo cerebro. Puesto que es capaz de degradar diversos neuropéptidos, incluyendo las encefalinas, se propuso que su localización podría estar diseñada para limitar la difusión de estos péptidos a través de ciertas barreras. Un argumento a favor de esta función es su amplia especificidad de sustrato, lo que serviría para hidrolizar un amplio espectro de péptidos. Concretamente, en los vasos sanguíneos cerebrales el enzima podría servir para limitar el contacto entre las neuronas y los materiales transportados por la sangre. La actividad de la APM constituye alrededor del 3% de la actividad total obtenida mediante la extracción de membranas de cerebro de rata con Tritón X-100. Además, el antisuero anti-APM no interacciona con las APMI y APMII de los trabajos previamente citados.

Chan y colaboradores (1983) estudiaron una AP asociada a las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de rata, y encontraron que el 40% de la actividad de AP total medida con Leu- $\beta$ -naftilamida estaba unida a membrana y podía solubilizarse con Tritón X-100. Los autores no probaron con otros sustratos, pero sí demostraron que el enzima era capaz de degradar el péptido Met-encefalina. Además, mostraba propiedades diferentes a la LeuAP y se inhibía con EDTA y puomicina.

En 1986, Giros y colaboradores recapitulan sobre las tres AP unidas a membrana en cerebro de rata descritas hasta el momento. Las tres son sensibles a la inhibición por bestatina. La primera, APMI, posee muy baja afinidad por las encefalinas (Hersh y McKelvy, 1981; Hersh, 1985), mientras que las otras dos poseen mayor afinidad. Una de ellas ha sido designada APMII (Hersh y McKelvy, 1981; Hersh, 1985), aminoencefalinas de membrana (Hui y Lajtha, 1983; Hui *et al.*, 1983b) o AP sensible a puromicina (Barclay y Phillips, 1978; Vogel y Altstein, 1979; Schwartz *et al.*, 1984; Gros *et al.*, 1985a), siendo también sensible a dicho antibiótico. Utilizando bestatina, puromicina y anticuerpos anti-APM, los autores concluyen que ambas AP participan en la degradación de encefalinas, pero que es predominante la actividad de la APM, a pesar de que se encuentra en menores concentraciones que las dos anteriores.

Aunque se consideraba que la APM restringía su localización a los vasos sanguíneos, un estudio posterior (Solhonne *et al.*, 1987) utilizando análisis mediante centrifugación diferencial, demostró que también se localizaba en fracciones que contenían membranas sinápticas, con lo que además de su papel en la prevención del acceso de péptidos circulantes al cerebro, se proponía su participación en la inactivación de los neuropéptidos liberados por las neuronas cerebrales.

Finalmente, se ha descrito una nueva AP a partir de la fracción membrana de cerebro de mono, al parecer distinta de las tres comentadas anteriormente (Shimamura *et al.*, 1988). Este enzima posee menor peso molecular y unas constantes cinéticas diferentes a las anteriores. Sin embargo, el contenido de este enzima en cerebro es muy bajo y su caracterización e importancia fisiológica están por determinar.

La APM que se utiliza comercialmente (Sigma) puede ser utilizada para hacer descender la presión arterial tanto en ratas normotensas como hipertensas (Wright *et al.*, 1991). El efecto es bloqueado por inhibidores como la actinonina, amastatina y bestatina, con lo que parece demostrado que el SRA-AP juega un papel preponderante en el mecanismo del control de la presión arterial.

De las AP capaces de hidrolizar residuos N-terminales de carácter ácido (APA, EC 3.4.11.17 y AspAP, EC 3.4.11.) reseñadas previamente en esta introducción y descritas en tejidos periféricos, solo existe un caso en la literatura donde se describa algo semejante en el SNC. Kelly y colaboradores (1983) aislaron en el citosol de cerebro de ratón una AP dirigida específicamente hacia péptidos con residuos N-terminales ácidos (Asp y Glu). El enzima también es capaz de hidrolizar dipéptidos y tripéptidos, aunque su actividad por los sustratos artificiales Asp- y Glu- $\beta$ -naftilamida sea muy escasa; aunque también lo sea para otros sustratos

---

derivados de la  $\beta$ -naftilamida. Las propiedades del enzima son diferentes de las de la APA y la AspAP mencionadas previamente.

Aunque no se ha descrito una verdadera oxitocinasa en el SNC, sí puede detectarse actividad hidrolítica sobre el sustrato Cys- $\beta$ -naftilamida e incluso actividad de CysAP (EC 3.4.11.3). Pero queda por demostrar si esta actividad no es idéntica a la detectada con el sustrato Leu- $\beta$ -naftilamida, lo que correspondería a una de las AP previamente descritas (AlaAP soluble y de membrana). Según Hopkinson y Hooper (1970), la distribución subcelular de oxitocinasa hipotalámica, medida con los sustratos de Cys- y Leu- $\beta$ -naftilamida, es prácticamente la misma en el SNC de perro, pero sugiere la posible existencia de una AP específica para oxitocina y vasopresina sensible a los niveles de estrógenos. Curiosamente, según los trabajos de Pliska y colaboradores (1971), los enzimas que degradan ambos péptidos se encuentran precisamente en el sitio de almacenamiento y liberación de los mismos y, en cualquier caso, la actividad proteolítica más abundante corresponde a una actividad AP.

La ArgAP lisosomal, también llamada AP-H (EC 3.4.22.16) es una aminoendopeptidasa poco estudiada a nivel de SNC. Solo se ha purificado a nivel de cerebro humano y bovino (Azaryan y Galoyan, 1987) y se ha comprobado que posee propiedades similares al enzima purificado en otros tejidos. Se inhibe por puromicina y requiere compuestos tiólicos (DTT) para su máxima actividad. Su mejor sustrato es Arg- $\beta$ -naftilamida y su pH óptimo 6.5. Es capaz de hidrolizar los péptidos Leu-encefalina y tuftsina con su actividad AP y bradikinina son su actividad endopeptidásica. Existe cierta similitud entre este enzima y la APMI purificada por Hersh y McKelvy (1981), que hidroliza preferentemente naftilamidas de aminoácidos básicos. Aunque queda por investigar la naturaleza de ambos enzimas, constituyen los dos únicos ejemplos de AP cerebrales no citosólicas con especificidad de sustrato similar a la ArgAP de la fracción soluble.

## 2. ALCOHOL ETÍLICO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

### 2.1. INTRODUCCIÓN.

El alcohol es la sustancia psicoactiva más utilizada en el mundo después de la cafeína. Su acción afecta virtualmente a todos los órganos del cuerpo, pero su principal efecto se ejerce sobre el SNC (Freund, 1973; Seixas y Eggleston, 1973; 1976; Deitrich *et al.*, 1989; Nutt y Glue, 1990; Little, 1991; Samson y Harris, 1992; Littleton y Little, 1994; Nevo y Hamon, 1995; Tsai *et al.*, 1995; Tabakoff y Hoffman, 1996; Tabakoff *et al.*, 1996; Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). También se tiene el concepto de que el alcohol es un veneno citoplasmático que causa la muerte de un cierto número de células (neuronas) en cada exposición (Edmondson *et al.*, 1956), ya que tiene la propiedad de ser deshidratante y precipitar las proteínas del citoplasma, siendo capaz de lesionar las células con las que se pone en contacto (Gaddum, 1959).

La ingesta moderada no acarrea riesgos directos para los diferentes sistemas fisiológicos, pero su consumo excesivo o crónico a largo plazo se asocia a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios del SNC, además del resto de tejidos como hígado, corazón, músculo esquelético, páncreas o tracto gastrointestinal (Fadda y Rossetti, 1998). El daño en el SNC, que puede ser atribuible a la intoxicación aguda, estaría limitado a los desórdenes funcionales tales como el envenenamiento de alcohol, el daño cerebral, las interacciones droga-alcohol y la disminución del umbral de ataque en una resaca o retirada (Mucha y Pinel, 1979). Estos efectos agudos son generalmente reversibles, si bien los casos de envenenamiento se deben a la depresión funcional de los centros respiratorios.

El alcohol que aparece en mayor proporción en las bebidas alcohólicas es el etanol, aunque estas también contienen pequeñas cantidades de otros alcoholes. El etanol o alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ), en términos farmacológicos, pertenece al grupo de los alcoholes alifáticos de cadena abierta, siendo este el más importante (Grollman y Grollman, 1970; Crossland, 1980). Aunque actualmente es poco utilizado como medicamento (Laurence y Bennett, 1980; Meyers *et al.*, 1981), es de gran importancia

por servir de introducción para la farmacología de los anestésicos generales y los hipnóticos, con los que se relaciona íntimamente (Clark, 1942).

## 2.2. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DEL ALCOHOL ETÍLICO.

### 2.2.1. Absorción del Etanol.

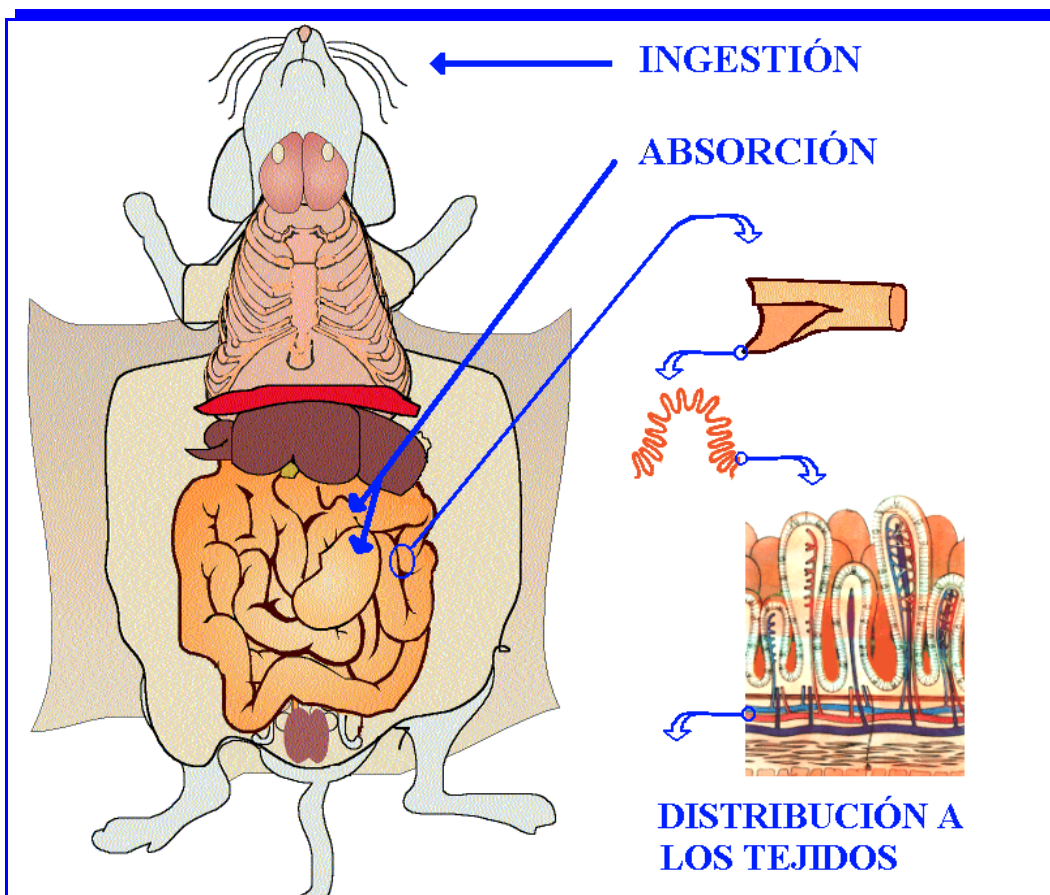
Tras la ingesta de alcohol etílico por vía oral, este es absorbido por difusión simple casi en su totalidad por el tracto gastrointestinal (preferentemente duodeno y yeyuno) (Meyers *et al.*, 1981) debido al rápido tránsito por el estómago vacío. Pero cuando se consume con comida o el estómago está lleno, el etanol se absorbe en el estómago de forma mas rápida (Cortot *et al.*, 1986) (*figura 1.2.1.*). El índice de absorción del etanol se determina parcialmente por factores genéticos (Kopun y Propping, 1977), aunque todavía no se conoce exactamente el mecanismo. No obstante, el índice de absorción del estómago o del intestino delgado contribuye a la determinación de la cantidad de etanol que aparece en la circulación sistémica y también en el SNC. Y es que tras ser absorbido, el etanol pasa inmediatamente a la sangre por la circulación portal, a través del hígado, y seguidamente se distribuye a todo el cuerpo por la circulación sistémica mediante enzimas de la mucosa gástrica e intestinal y del hígado. Y es que, debido a su bajo peso molecular, pasa fácilmente por las membranas de forma que en cuanto se ingiere empieza a ser absorbido (Meyers *et al.*, 1981).

Los efectos de este primer paso del metabolismo son mas pronunciados con dosis de etanol bajas-moderadas, tomadas con la comida o tras la ingesta de ella. Se habla de cuatro fenómenos en este primer paso:

- Durante la absorción las concentraciones de alcohol en la vena porta e hígado son mayores que en la circulación sistémica y en otros órganos de la periferia. Además, hay mayor índice de eliminación del etanol debido a la cinética de Michaelis-Menten y a la actividad de enzimas con elevada Km por el etanol, como es la  $\pi$ -alcohol deshidrogenasa ( $\pi$ -ADH) y el sistema etanol-oxidante microsomal (sistema MEOS).
- El retraso en el vaciamiento gástrico hace que la liberación del etanol hacia el duodeno y yeyuno sea mas lenta, donde se absorbe el etanol mas eficientemente que en el estómago.
- El vaciamiento gástrico lento permite que los enzimas ADH gástricos metabolicen el etanol.

- Esta misma situación de vaciamiento gástrico lento, disminuye la carga de etanol presentada al hígado y, como resultado de la cinética de Michaelis-Menten, una pequeña fracción de etanol llega a la circulación (Ammon *et al.*, 1996; Dohmen *et al.*, 1996).

Estos efectos del primer paso del metabolismo (cinética del metabolismo y absorción) son importantes para saber cuánto y cómo de rápido una dosis moderada de etanol llega a la circulación sistémica y cerebro.



**Figura 1.2.1.** Representación de los pasos que sigue el etanol. Una vez ingerido se absorbe principalmente en el tracto gastrointestinal (duodeno/yejuno), aunque también puede hacerlo en el estómago si se acompaña de comida. Tras la absorción el etanol pasa a la circulación sistémica y de aquí a todos los tejidos.

### 2.2.2. Distribución del Etanol en los Diferentes Tejidos.

Una vez en la sangre, el alcohol pasa a los tejidos (Laurence y Bennett, 1980) a través de todo el cuerpo acuoso (Laurence y Bennett, 1980; Meyers *et al.*, 1981), ya que el establecimiento del equilibrio entre la concentración extracelular e intracelular se da mas rápidamente en órganos bien vascularizados con un flujo sanguíneo alto, como son cerebro, hígado, pulmones y riñones. Esto se debe a la gran hidrosolubilidad del alcohol (Bowman y Rand, 1980), de modo que su concentración en los diversos tejidos es directamente proporcional a su contenido acuoso e inversamente proporcional a su contenido en lípidos (Bowman y Rand, 1980). Razón esta por la que tras la administración oral de etanol y tras el establecimiento del equilibrio entre todos los tejidos y compartimentos extracelulares, la concentración de etanol en cerebro y sangre arterial es mayor que en músculos y venas periféricas (Li, 1983). Luego la concentración de etanol en aire refleja mejor el nivel existente en el SNC que las medidas en sangre venosa.

### 2.2.3. Metabolismo y Eliminación Enzimática del Etanol.

El etanol no se acumula en órganos específicos ni unidos a componentes celulares. Se elimina casi totalmente por el metabolismo oxidativo en el hígado. La capacidad de metabolizar etanol por el cerebro ha sido objeto de debate ya que algunos grupos creen que el metabolismo del etanol se hace en el tejido cerebral mientras que otros no han podido demostrarlo (Zimatkin y Deitrich, 1997). Sí que algunos estudios han demostrado el metabolismo del alcohol en cerebro, aunque el índice de dicho metabolismo es menor que el existente en hígado (Veloso *et al.*, 1972; Tabakoff y Von Wartbutg, 1975). Y esto será debido a que el hígado tiene mayor peso que el cerebro (4 veces más). Luego, tras la fase de equilibrio, lo que determina los efectos farmacológicos y potencialmente patológicos del etanol en el cerebro es el índice de su metabolismo oxidativo por enzimas hepáticos (Eckardt *et al.*, 1998).

Existen diversos sistemas enzimáticos con diferente afinidad por el etanol que pueden metabolizarlo. El 95% del etanol administrado desaparece del organismo por un proceso de oxidación (Crossland, 1980) hacia metabolitos muy reactivos, y se hace principalmente mediante tres sistemas enzimáticos (Li, 1983) como son la ADH, aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la catalasa (*figura 1.2.2.*). Las etapas son las siguientes (Goldstein *et al.*, 1974; Lieber, 1975):

- El etanol se metaboliza a acetaldehído principalmente por la ADH y mediante el coenzima I (nicotin-adenin-dinucleotido; NAD) que lo transforma en NAD reducido (NADH). Esto ocurre en el hígado, donde se encuentra la ADH (Lieber, 1975). Pero este sistema se satura rápidamente y entonces etanol

también se metaboliza por una vía accesoria (Lieber, 1975) hasta acetaldehído por medio de una oxidasa presente en el retículo endoplasmático liso de microsomas hepáticos (Lieber, 1975), el sistema MEOS, que requiere NADPH (nicotin.adenin-dinucleótido-fosfato reducido) y que se transforma en NADP (nicotin.adenin-dinucleótido-fosfato) existiendo consumo de oxígeno. Aunque poca cantidad de etanol se metaboliza por esta última vía en circunstancias normales, el sistema microsomal se va haciendo más importante al aumentar la dosis. Aquí tiene importancia la catalasa, aunque probablemente contribuya poco a todas las reacciones en condiciones fisiológicas normales, debido su limitación por la disponibilidad del co-sustrato  $H_2O_2$ .

- El acetaldehído se transforma en ácido acético gracias a la ALDH y NADP, que luego se convertirá en acetyl-coenzima A (-CoA) o acetato activo. Este proceso que se da en hígado y parcialmente en cerebro y riñón (Clark, 1942), ocurre en mitocondrias, necesitando NAD que se transforma en NADH.
- El acetato activo se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para convertirse finalmente en  $CO_2$  y  $H_2O$  (Laurence y Bennett, 1980) en las mitocondrias.

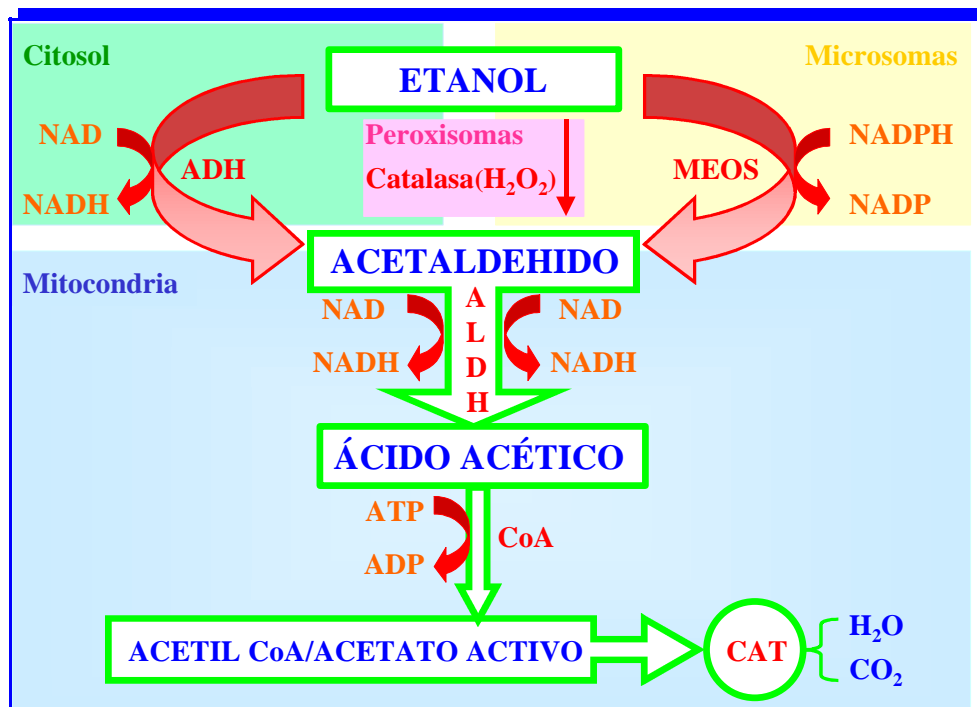


Figura I.2.2. Esquema del metabolismo del etanol en los diferentes compartimentos celulares.

La ADH se encuentra en el citosol en forma de alta y baja  $K_m$ , metabolizando al etanol en un amplio rango de concentraciones. Existen diferentes formas moleculares de la ADH en hígado de humanos (son dímeros con subunidades de 40 KDa que tienen 2 átomos de zinc por subunidad). La forma  $\sigma$ -ADH1 tiene mayor  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  por el alcohol que las demás ADH de la clase I, además puede jugar un papel importante en el primer paso del metabolismo (Eckardt *et al.*, 1998).

El sistema MEOS (isoformas del citocromo P450, que es un citocromo microsomal especializado, y la NADPH-citocromo-P450-reductasa) tiene alta  $K_m$  por el etanol (10 mM) y, como ya se ha visto, su contribución es significativa solo tras el aumento moderado de la concentración de etanol en el hígado (Eckardt *et al.*, 1998).

La ALDH también tiene formas de alta y baja  $K_m$ , siendo la más importante y principal responsable de la oxidación del acetaldehído a acetato la forma de baja  $K_m$  que se encuentra en la mitocondria (ALDH2). La ALDH tiene múltiples formas moleculares en el hígado humano pero solo las isozimas de la clase I y II están implicadas en la oxidación del acetaldehído. Son dependientes de  $NAD^+$ . La ALDH1 es la isoenzima con mayor  $K_m$  de la fracción subcelular citosólica. ALDH1 y 2 son moléculas tetraméricas con subunidades de unos 500 aminoácidos cuya secuencia es idéntica en un 68% (Jornvall *et al.*, 1987).

Como se ha visto, cuando la concentración de etanol es mayor, el índice de eliminación es más rápido debido a la existencia de sistemas enzimáticos de alta  $K_m$ , como son MEOS,  $\pi$ -ADH y  $\beta_3$ -ADH (Eckardt *et al.*, 1998).

El equilibrio de la reacción de la ADH a pH 7.3 favorece la reducción del aldehído hacia alcohol. Para que ocurra la oxidación del etanol la concentración constante de acetaldehído y de NADH tiene que ser baja. La reacción de la ALDH es irreversible en la dirección de la formación de acetato, y la alta eficiencia catalítica de la ALDH2 junto con el elevado índice de reoxidación del NADH hacia  $NAD^+$  por la mitocondria permite al metabolismo del etanol continuar en unos índices razonables en el hígado. En la eliminación del etanol, la concentración de éste en hígado está en el rango de mM, mientras que las concentraciones de acetaldehído están en el de  $\mu M$ . La reacción de la ADH está limitada por el metabolismo del etanol, pero el índice de esta reacción se inhibe por altas concentraciones de acetaldehído y NADH (Crabb *et al.*, 1983). Numerosos factores, incluyendo los factores genéticos relacionados con el metabolismo del etanol, más que con experiencias con la bebida, y otros factores genéticamente determinantes y ambientales tendrán una función importante cuando el SNC u otros órganos del cuerpo se expongan al etanol tras el consumo de bebidas alcohólicas. Luego la

capacidad de biotransformación del etanol, la velocidad de desaparición del organismo y la disminución del nivel sanguíneo, no depende de la concentración inicial ni de la cantidad (Clark, 1942; Grollman y Grollman, 1970; Meyers *et al.*, 1981). La velocidad de oxidación es constante (Goldstein *et al.*, 1974) y solamente depende del peso corporal del individuo (Goldstein *et al.*, 1974; Browman y Rand, 1980) y del peso del hígado; Se trata de un proceso descrito por un modelo sencillo de orden pseudocero (Widmark) o una cinética simple de Michaelis-Menten (Von Wartburg, 1989). La velocidad de transformación del alcohol en acetaldehído alcanza su máximo (Laurence y Bennett, 1980) cuando se satura el sistema ADH-NAD (Goldstein *et al.*, 1974). Como consecuencia de la saturación enzimática, la biotransformación se retarda. Luego al saturarse rápidamente la ADH, el índice del metabolismo del etanol es de orden cero, por lo que debido a esta cinética de orden cero el índice de consumo del etanol es más importante que la cantidad (cuanto mas alcohol se tome, mas entrará al organismo). Pueden ser apropiados los amplios rangos de concentración de etanol, teniendo en cuenta los diferentes índices de absorción y los efectos del primer paso del metabolismo, los modelos cinéticos de Michaelis-Menten multicompartamentales y multienzimáticos (Von Wartburg, 1989).

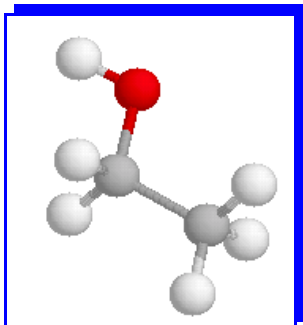
El acetaldehído (catabolito oxidativo reactivo del etanol) puede contribuir a los efectos en el SNC (Hunt, 1996), y aunque no penetra fácilmente al cerebro puede ser formado en tejidos cerebrales por la ADH III y el P450III<sub>1</sub>, que está presente en el cerebro (Zimatkin y Deitrich, 1997) y puede dañar directamente al SNC (Streissguth *et al.*, 1980b; King *et al.*, 1988; Lieber, 1988). También la acumulación de etil ésteres de ácidos grasos, formados por el metabolismo no-oxidativo del etanol, ha sido propuesto como un posible mecanismo de neurodegeneración (Laposata y Lange, 1986; Bora y Lange, 1993). Aunque la contribución de los productos del metabolismo del etanol a la neurodegeneración no se tuvieron en cuenta, es la retirada del etanol crónico mas que la intoxicación crónica la responsable del daño para las neuronas, incluso existen evidencias de que el etanol puede proteger contra la neurodegeneración inducida por la retirada de alcohol (Chandler *et al.*, 1993a, b).

La ingesta del etanol *per se* puede no dar una definición adecuada de dosis moderadas, crónicas, etc., sobre todo al considerar el efecto del alcohol en el SNC. Las variables asociadas a la ingesta, absorción, distribución y metabolismo del etanol pueden dar diferencias en los niveles de alcohol en sangre y cerebro debido a que existen diversos factores que están implicados en este hecho, tales como las variaciones entre individuos, en las diferentes condiciones de edad, etnia, etc., así como el tipo de bebida, si se acompaña de comida y/o la composición de ambas.

Tras la fase de absorción y distribución, los índices de eliminación del etanol se estiman midiendo la concentración de este en sangre y aire (Eckardt *et al.*, 1998).

---

### 2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ETANOL.



**Figura I.2.3.** Estructura de la molécula de etanol.

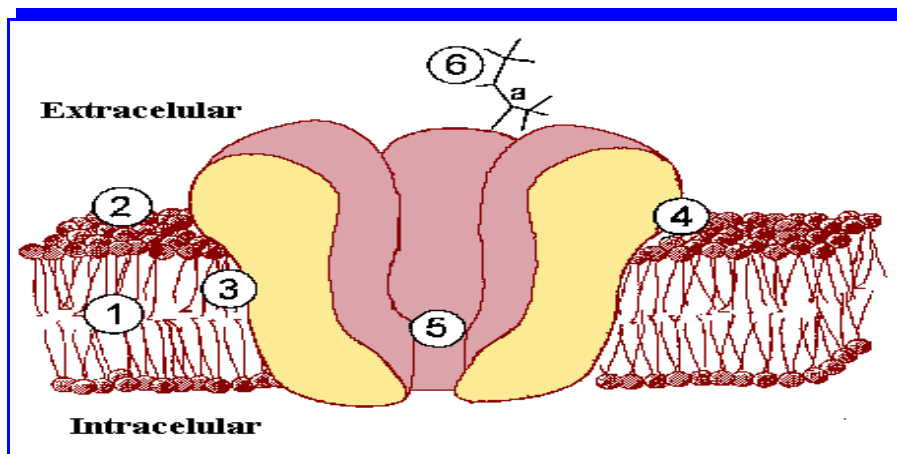
La complejidad y multitud de los efectos que produce en los sistemas neuronales el etanol depende de la simplicidad de su estructura química. El etanol es una droga débil, cuya molécula no contiene ningún carbono asimétrico. Así, su interacción con sustratos biológicos no es estereo-selectiva (*figura I.2.3.*).

El grupo hidroxilo (OH) favorece la formación de puentes de hidrógeno con aceptores o dadores de electrones de proteínas o cabezas polares de las membranas fosfolipídicas (Franks y Lieb, 1978; Brockerhoff *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990; Abaham *et al.*, 1991; Barry y Gawrish, 1994). Esta formación de puentes de hidrógeno hace al etanol soluble en agua y mediante estos puentes de hidrógeno puede modificar la organización de las moléculas de agua en la matriz extracelular (Yurttas *et al.*, 1992) alterando también la solvencia de los ligandos o de los iones que interaccionan con las proteínas receptoras. Este mecanismo de solvencia puede contribuir a la peculiar susceptibilidad que tienen los canales dependientes de ligando de los transmisores y los canales iónicos al etanol (Fadda y Rossetti, 1998).

Además, el otro extremo final de la molécula del etanol contiene un grupo lipofílico que puede interaccionar con dominios no polares. Por tanto, y al contrario de lo que se cree, el etanol tiene baja solubilidad en lípidos. Se localiza en la región de las cabezas polares y muy poco entre los lípidos de membranas neuronales (Barry y Gawrish, 1994). Estas propiedades físico-químicas favorecen las fuerzas de interacción del etanol con sustratos biológicos. Aunque el etanol puede afectar al balance térmico natural que mantiene la arquitectura de las membranas y puede alterar los dominios que determinan las interacciones proteína-membrana y proteína-ligando (Wang *et al.*, 1993), también se ha visto que puede actuar directamente en las proteínas de las membranas produciendo cambios conformacionales que alteren su función (Eyring *et al.*, 1973; Franks y Lieb, 1982; 1991; 1994; Lovinger *et al.*, 1989; Dickinson *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Peoples y Weight, 1995; Lovinger, 1997). Dicho efecto limitante no se debe a la interacción del alcohol con la membrana lipídica, sino que implica la interacción del alcohol con un bolsillo conformacional, teniendo una arquitectura esférica relativamente rígida en la estructura de la proteína receptora (Peoples y Weight, 1995).

La genética molecular muestra evidencias de la interacción del etanol con sitios específicos localizados en proteínas de membrana. Por mutagénesis dirigida se

han identificado dos sitios inhibitorios, en el receptor muscular de la acetilcolina (ACh) (Forman *et al.*, 1995) y en el dominio N-terminal extracelular de un receptor neuronal de la  $\alpha 7$ -ACh (Yu *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Además, el etanol ha mostrado interacción con un sitio en los dominios transmembrana del receptor quimera de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5HT), 5HT<sub>3</sub> (Zhang *et al.*, 1997). En construcciones de receptores quiméricos (Mihic *et al.*, 1997) se ha identificado una región de 45 residuos aminoácidos en los dominios transmembrana 1 y 3 del receptor ácido- $\gamma$ -N-butírico A (GABA<sub>A</sub>) y del receptor de la Gly que ponen en duda la modulación alostérica de este receptor por etanol. Otros estudios en oocitos de *Xenopus* muestran la interacción directa que existe entre etanol y proteínas, también por el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wright *et al.*, 1996). En este receptor el etanol interacciona con un sitio alostérico que es independiente del sitio de reconocimiento por el agonista Glu o Gly y reduce la eficacia de los agonistas por modulación de las cinéticas de la entrada de los canales (Fadda y Rossetti, 1998).



**Figura I.2.4.** Esquema de los dominios celulares con los que el etanol puede interactuar en un hipotético receptor acoplado a un canal iónico. El etanol puede producir cambios en la arquitectura de la membrana alterando el orden o composición de los lípidos de membrana (1) o modificando la estructura fosfolípida entre los microdominios proteína-lípidos (3). El etanol interacciona primeramente con la cabeza polar de fosfolípidos (2) en la interfase/dominio lípidos-agua formando puentes de hidrógeno. Estas interacciones producen pequeños efectos en la función de las proteínas de membrana y solamente con altas concentraciones de etanol (>100 mM). Interacciones específicas-directas con la estructura aminoácida de la proteína se dan a concentraciones farmacológicamente relevantes (10-50 mM) entre los bolsillos hidrofóbicos de los dominios agua-proteína. Estos sitios pueden cerrarse en la interfase agua-lípidos (4) como en los receptores GABA<sub>A</sub> y de Gly, o pueden estar asociados al mecanismo de entrada del canal (5), como el receptor NMDA o en los sitios alostéricos en el dominio extracelular N-terminal (a) que tiene el sitio de reconocimiento para el ligando endógeno (6) como es el caso del receptor de la ACh.

Resumiendo, los efectos farmacológicos del etanol no son selectivos en tanto que pueden afectar a la organización de la membrana, la función de los enzimas que están unidos a la membrana, los canales iónicos, los enzimas y las proteínas implicadas en la señal de trasducción y expresión de genes, las proteínas transportadoras y los ionóforos acoplados a receptores (Tabakoff y Hoffman, 1996a; Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). Por el contrario sus efectos son específicos en tanto que el etanol interacciona con sitios discretos en cada proteína particular que ponen en duda la función proteica y el funcionamiento celular. A continuación se muestran esquemáticamente los dominios celulares con los que el etanol puede interaccionar en un receptor hipotético (Fadda y Rossetti, 1998) (*figura I.2.4.*).

#### **2.4. EFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO A NIVEL PERIFÉRICO.**

De forma breve indicar que en el metabolismo energético, el etanol no tiene un efecto directo (Grollman y Grollman, 1970), pero sí que en la etapa de depresión y sueño inducida por el etanol se da paralelamente una disminución del metabolismo, sucediendo lo contrario durante la excitación (Grollman y Grollman, 1970). Sobre el metabolismo de los carbohidratos, el alcohol puede producir hiperglucemia (Lieber, 1975; Laurence y Bennett, 1980) por estimulación de la gluconeogénesis, aunque como respuesta y para controlar esta situación se puede producir hipoglucemia. También puede aumentar la lipogénesis y disminuir la oxidación de las grasas (Lieber, 1975).

El alcohol es una fuente de energía y al oxidarse libera 7 Kcal/g (Grollman y Grollman, 1970; Bowman y Rand, 1980; Meyers *et al.*, 1981), luego es un alimento energético y por otra parte no requiere digestión en el tracto gastrointestinal, se absorbe rápidamente (Laurence y Bennett, 1980) y se utiliza a mayor velocidad que la mayoría de los alimentos (Grollman y Grollman, 1970). El etanol, como alimento, es capaz de sustituir a los carbohidratos, grasas o proteínas como fuente de calor y trabajo (Meyers *et al.*, 1981), pudiendo ejercer una acción de ahorro de proteínas (Grollman y Grollman, 1970). Ahora bien, el alcohol es un mal alimento (Clark, 1981) ya que se oxida a una velocidad constante y no se adapta a las necesidades metabólicas del individuo, los tejidos no pueden concentrarlo ni almacenarlo para una utilización posterior y es una sustancia tóxica que ingerida en exceso a largo plazo produce alteraciones graves en el organismo como ya se ha indicado (Litter, 1988).

Sobre el hígado, la biotransformación de etanol necesita NAD y este coenzima puede ser reducido en casos de ingestión masiva de alcohol. Con la depleción de NAD, muchos compuestos como Glu, lactato, se acumulan en el cuerpo produciendo disfunciones en el hígado (Rogers *et al.*, 1981). Esto lleva a la

formación de un hígado cirrótico y con grasas, característico de estos casos, además de producirse daños en la gluconeogénesis e hipoglucemia. El daño resultante en el metabolismo de la glucosa tiene efectos mentales debido al alcohol, ya que el cerebro es un órgano insulino-dependiente. Los efectos en la fluidez de las membranas también pueden alterar la absorción de vitaminas hidrosolubles y aumentar las secreciones gástricas (HCl y jugos digestivos) que contribuyen a la producción de gastritis y pancreatitis. El alcohol actúa como astringente, deshidratando tejidos, que contribuye a la irritación de la mucosa. La deficiencia en vitaminas hidrosolubles se asocia a la pérdida de antioxidantes necesarios y esenciales para reducir el daño sobre los tejidos, sobre todo del SNC (Carvey, 1998).

### **2.5. EFECTOS DEL ALCOHOL ETÍLICO SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

El mecanismo de acción del etanol implica muchos sitios en el SNC, por medio de su influencia en la función de la mayoría de los sistemas neuronales a nivel molecular, celular o de sistemas. Esto queda evidenciado por la reversibilidad de la interacción del etanol con sustratos neurobiológicos, las alteraciones en las funciones cerebrales asociadas a la ingesta crónica de etanol son el resultado de modificaciones adaptativas (plásticas) que tienen lugar en el cerebro en respuesta a los efectos del etanol. Estos cambios pueden ser de corta duración o duraderos pero reversibles, o pueden ser permanentes y estar asociados a procesos degenerativos en algunas estructuras cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Hay que tener cuidado al extrapolar datos de roedores a humanos porque los animales muestran mayor resistencia a los efectos del etanol (Litter, 1988). Por lo general, en animales de experimentación la administración de alcohol produce un estado depresivo evidenciado por sueño, con pérdida de los reflejos de la postura y que a altas dosis lleva a la muerte por parada respiratoria (Frommel y Seydoux, 1964).

La acción farmacológica fundamental del alcohol se ejerce sobre el SNC (Gaddum, 1959; Laurence y Bennett, 1980) y es depresora general de acción inespecífica o no selectiva (Ley de Jackson), disminuyendo la función de todos los centros nerviosos en sucesión ordenada (Grollman y grollman, 1970; Bowman y Rand, 1980; Crossland, 1980; Laurence y Bennett, 1980; Clark, 1981; Meyers *et al.*, 1981; Bradley *et al.*, 1986; Carlsson, 1987; Ashton, 1993), cuyas manifestaciones están relacionadas con la concentración sanguínea de la droga (Gaddum, 1959; Bradley *et al.*, 1986; Carlsson, 1987; Litter, 1988; Ashton, 1993). Podría hablarse de cuatro periodos en los que queda claro el conocido perfil bifásico del etanol (Pohorecky, 1977; Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994).

- En una situación normal (Periodo O), los centros corticales superiores, con su influencia inhibitoria sobre los centros cerebrales inferiores, permiten un comportamiento sano, sin dar libertad a los instintos primitivos liberados bajo la influencia del alcohol (Bowman y Rand, 1980).
- Periodo I: En situaciones iniciales de ingesta o de baja concentración de alcohol (Gaddum, 1959; Bowman y Rand, 1980; Meyers, *et al.*, 1981) se produce un incremento de la actividad del individuo debido a la liberación de los centros cerebrales inferiores por depresión de los centros corticales superiores, que normalmente ejercen una influencia inhibitoria sobre los primeros (Gaddum, 1959; Clark, 1942; Crossland, 1980; Laurence y Bennett, 1980; Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994). Y esto se manifiesta en una estimulación motora o funcional donde se produce una disminución del tiempo de reacción, del juicio y precisión del funcionamiento del individuo (memoria, atención) (Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994). El alcohol tiene la propiedad de atenuar la ansiedad, con acción sedante, semejante a los hipnóticos y sedantes (Meyers *et al.*, 1981). Es frecuente la producción de sueño, lo que indica que se ha actuado sobre la formación reticular del tallo cerebral (Laurence y Bennett, 1980).
- Periodo II: Se afectan los centros subcorticales del tallo cerebral, incluyendo los vestibulares, y cerebelo (Grollman y Grollman, 1970). Las alteraciones funcionales son evidentes (Clark, 1942), se pierde la coordinación, existe confusión, ataxia. Existe pérdida absoluta del autocontrol por falta de la inhibición (Crossland, 1980).
- Periodo III: Se afectan los centros espinales (Bowman y Rand, 1980), provocando sueño profundo, inconsciencia, estupor, llegando al coma, semejante a la anestesia general (Crossland, 1980).
- Periodo IV: Se deprimen los centros bulbares (vasomotor, respiratorio) existiendo peligro de muerte (Meyers *et al.*, 1981); el coma es profundo, la piel está húmeda y fría, el pulso acelerado y las respiraciones lentas (Bowman y Rand, 1980).

Estos periodos corresponden aproximadamente a los que producen los anestésicos generales (Meyers *et al.*, 1981), pero se diferencian de ellos en que el segundo periodo es mucho mas largo para el alcohol (Litter, 1988).

Todo esto demuestra que el alcohol es un depresor, especialmente de los centros corticales inhibidores superiores (Clark, 1942; Laurence y Bennett, 1980) y al respecto debe señalarse que los reflejos condicionados inhibidores son deprimidos por el alcohol más fácilmente que los reflejos positivos (Gaddum, 1959).

Por otro lado, el desorden más relacionado al alcoholismo se da por la desmielinización de los nervios periféricos, lo que se llama neuropatía periférica. El alcohol en contacto con el nervio, bloquea los impulsos sensitivos y motores provocando anestesia y parálisis (Bowman y Rand, 1980). Esta se asocia a la disminución de la agudeza sensorial, parestesia y disminución de la velocidad de conducción (Fadda y Rossetti, 1998). La desmielinización refleja la deficiencia en tiamina (vitamina B<sub>12</sub>) (Victor *et al.*, 1989), y esta carencia de tiamina daña al SNC (Kril, 1996; Longlais *et al.*, 1996) causando un desorden neurológico, por la combinación de diversos factores como son: la malnutrición o una dieta inadecuada (falta de vitaminas), la reducción de la absorción gastrointestinal y la disminución del almacenamiento hepático de esta vitamina y el uso dañino del alcohol (Thomson *et al.*, 1983). Consecuencia de esto, en el cerebro de alcohólicos han sido observadas una gran variedad de cambios neuropatológicos y morfológicos denominado encefalopatía de Wernicke. Y aunque es posible caracterizar cambios patológicos en diferentes regiones cerebrales no está claro como es que la deficiencia en tiamina causa lesiones cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Solamente los alcohólicos deficientes en tiamina desarrollan la encefalopatía de Wernicke, quizás porque han heredado (Blass y Gibson, 1977; Mukherjee *et al.*, 1987) o adquirido (Jeyasingham *et al.*, 1987) anomalías del enzima dependiente de tiamina, transcetolasa, que va a reducir su afinidad por la tiamina (Charness, 1996). La tiamina es un cofactor de la transcetolasa, la  $\alpha$ -cetoglutarato-dehidrogenasa y de la piruvato deshidrogenasa (Victor *et al.*, 1989) y puede funcionar en la conducción axonal y transmisión sináptica (Iwata, 1982). Estas enzimas dependientes de tiamina juegan un papel importante en el uso de la energía cerebral. Se propuso que la deficiencia en tiamina inicia el daño neuronal mediante la inhibición del metabolismo energético en regiones cerebrales con requerimientos metabólicos altos (Butterworth *et al.*, 1993). Además se demostró que la carencia de tiamina causa disminución en el uso de la glucosa cerebral (Hakim, 1984; Hakim y Pappius, 1983).

Estudios en animales superiores sugieren que la excitotoxicidad puede ser parte del camino final que va de la deficiencia en tiamina al daño neuronal. Las lesiones de Wernicke pueden prevenirse quitando el Glu que se acumula en determinadas regiones cerebrales (Langlais y Zhang, 1993). El hecho de que el tratamiento crónico con etanol aumente la densidad de los receptores NMDA en

determinadas regiones cerebrales (Grant *et al.*, 1990b; Gulya *et al.*, 1991) sugiere la existencia de un posible mecanismo por el que la ingestión crónica de etanol puede potenciar la excitotoxicidad del Glu en la encefalopatía de Wernicke (Lovinger, 1993).

Pero, el 80% de los pacientes alcohólicos que se recuperan de la encefalopatía de Wernicke muestran el daño selectivo de la memoria denominado síndrome amnésico de Korsakoff (Victor *et al.*, 1989). En general, aparece un estado de confusión mental donde las funciones cognitivas como la inteligencia y la memoria están dañadas, junto con debilidad emocional, ataxia y/o parálisis de los músculos externos del ojo (Bowden, 1990; Jacobson *et al.*, 1990).

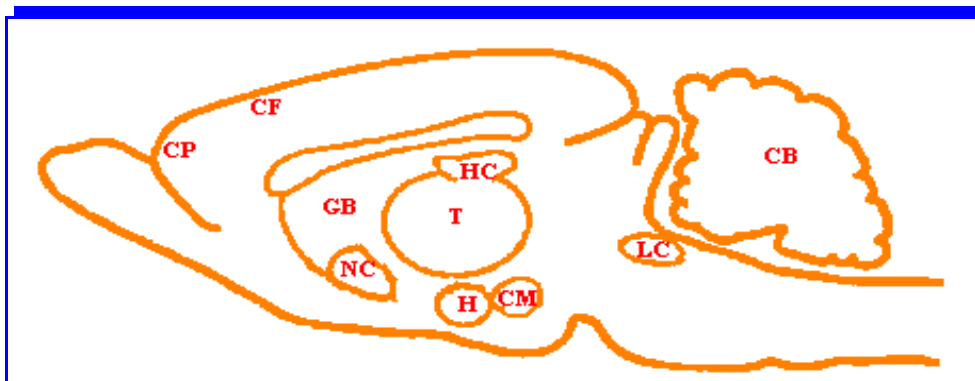
Este síndrome de Korsakoff no es una secuela frecuente de la encefalopatía de Wernicke en individuos no alcohólicos (Freund, 1973), y aunque es posible que los efectos neurotóxicos del etanol empeoren el desorden cerebral de la deficiencia en tiamina, está claro que el síndrome de Korsakoff puede darse en ausencia de la ingesta de etanol (libro del alcohol). Cuando se dan ambos casos se habla del síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) (Victor y Yakoulav, 1955; Korsakoff, 1889; 1890).

Cuando durante la vida de un individuo se ha ingerido bastante alcohol se predicen peores consecuencias en el rendimiento neuropsicológico (Eckardt *et al.*, 1995). En la permanencia de la abstinencia se pueden resolver alguno de los déficits observados (Bennett, 1960; Volkow *et al.*, 1994).

Estudios neuropatológicos han mostrado la reducción de peso y volumen que muestra el cerebro en alcohólicos (Bergman *et al.*, 1980; Carlen *et al.*, 1981; Harper y Blumbergs 1982; Wilkinson 1982; Ron 1983; Harper y Kril 1985; Torvik 1987a,b; Lindboe y Loberg 1988). Se ha mostrado una correlación negativa entre la cantidad de alcohol consumido durante toda la vida y el grado de atrofia cerebral (pérdida de materia blanca) (Harding *et al.*, 1996; Krill *et al.*, 1997). La reducción del peso del cerebro y volumen se justifica por una reducción en el volumen de la materia blanca de los hemisferios cerebrales mas que por una pérdida de tejido cortical (Harper *et al.*, 1985; De la Monte, 1988; Pfefferbaum *et al.*, 1992), que es proporcional al aumento del espacio entre cerebro y cráneo, el volumen ventricular (De la Monte, 1988). Existe un componente de la pérdida que es reversible en periodos de abstinencia (Carlen y Wilkinson, 1987; Shear *et al.*, 1994; Pfefferbaum *et al.*, 1995; Trabert *et al.*, 1995). Otros estudios han demostrado también una disminución del volumen de la materia gris (Pfefferbaum *et al.*, 1992; Shear *et al.*, 1994). Muchos de los cambios producidos en la materia blanca parecen estar relacionados con cambios en la mielinización. Aquellos que tienen complicaciones adicionales como cirrosis

o el SWK tienen las mayores reducciones de peso del cerebro (Harper y Blumbergs, 1982; Vitor *et al.*, 1989).

Como ya se ha visto existen pocas dudas de que el etanol, en un periodo de tiempo considerable, puede originar daños en diferentes estructuras que se asocian a un amplio rango y variabilidad de daños neuroanatómicos. A continuación se muestran algunas de las estructuras que sufren una mayor reducción debido a que contienen gran cantidad de materia blanca (Nasrallah *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1987; Harper y Krill, 1988; Pfefferbaum *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1996) (figura I.2.5.):



**Figura I.2.5.** Esquema de las diferentes zonas en las que el etanol puede actuar produciendo una reducción de materia blanca; Cerebelo (CB); Cerebro basal: núcleos colinérgicos (NC); Diencéfalo: cuerpos mamilares (CM), hipotálamo (HT), tálamo (T); Ganglios basales (GB); Lóbulos frontales: corteza frontal (CF), corteza prefrontal (CP); Lóbulo temporal: hipocampo (H); Locus ceruleus (LC).

- Lóbulos frontales. La región que parece estar más afectada que otras regiones corticales (Walsh, 1985; Mayes *et al.*, 1988; Shimamura *et al.*, 1988; Kril y Harper, 1989; Jacobson y Lishman, 1990; Jernigan *et al.*, 1991a,b) donde existe un metabolismo menor respecto a individuos que no toman alcohol (Samson *et al.*, 1986; Hata *et al.*, 1987; Sachs *et al.*, 1987; Wik *et al.*, 1988; Gilman *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1993). Y es que debido a que el etanol disminuye el flujo sanguíneo en el lóbulo medio frontal (Adams *et al.*, 1993), esta zona y regiones periventriculares también muestran menor flujo sanguíneo cerebral (Hunter *et al.*, 1989; Melgard *et al.*, 1990), produciéndose una reducción del metabolismo de la glucosa, además de daños en la función de la memoria, ya que las zonas implicadas en esta son la corteza frontal, ventromedial y las conexiones que existen entre estas. Esta región a su vez está conectada con estructuras del sistema límbico y del diencéfalo (Samson *et al.*, 1986; Gilman *et al.*, 1990). Debido al papel que tiene la corteza

prefrontal en la motivación y percepción, es posible que las carencias cognitivas asociadas al daño del lóbulo frontal se deban a una disfunción en la neurotransmisión dopaminérgica mesocortical en individuos que toman etanol, ya que la corteza prefrontal está íntimamente ligada a la zona basal del cerebro, a las estructuras del lóbulo medial y al diencefalo (Fadda y Rossetti, 1998).

- Diencefalo. El diencefalo, incluye dos regiones principales, tálamo e hipotálamo. Estas estructuras, que están implicadas en la memoria, también parecen ser vulnerables en alcohólicos. Los cuerpos mamilares del hipotálamo, el núcleo talámico medio dorsal (MD) y las fibras nerviosas que conectan estas dos estructuras son las principales zonas dañadas (Victor *et al.*, 1971; Alling y Bostrom, 1980; Markowitsch, 1988; 1989; Squire *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1995), junto a un ensanchamiento del tercer ventrículo (Shimamura *et al.*, 1988; Jacobson y Lishman, 1990; Jernigan *et al.*, 1991a). Existen en la literatura bastantes patologías talámicas e hipotalámicas en alcohólicos, pero la mayoría relacionadas con pacientes con deficiencia en tiamina (SWK) (Harper, 1983; Victor *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1996; Harper y Butterworth, 1997). Existe relación entre el volumen del tálamo y la máxima cantidad de alcohol tomada al día (Kril *et al.*, 1997). Aunque no se dan anomalías microscópicas y macroscópicas específicas (Harper, 1998).
- Cerebro basal. Comprende los núcleos colinérgicos tales como el núcleo septal medial, núcleo de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. Arendt y colaboradores (1983) encontraron pérdidas significativas de neuronas en el núcleo basal de Meynert en pacientes Korsakoff, y otros autores han confirmado la muerte celular producida en neuronas colinérgicas del cerebro basal (Halliday *et al.*, 1994; Cullen y Halliday, 1995).
- Lóbulo medio temporal. Aquí se encuentra una mayor reducción de volumen (Jernigan *et al.*, 1991a,b). El déficit de volumen del hipocampo no es la causa de los daños en la memoria o de la amnesia, aunque puede contribuir al daño de la memoria cuando se combina con déficit de volumen en otras áreas cerebrales implicadas en la memoria como son el núcleo talámico y los cuerpos mamilares (Sullivan *et al.*, 1995). Aunque hay autores que han demostrado como el daño en el hipocampo por si solo es suficiente para producir una pérdida significativa (Press *et al.*, 1989). Se ha visto que hay neuronas en el hipocampo que son dañadas por el alcohol selectivamente (Walker *et al.*, 1980b; McMullen *et al.*, 1984), y también se ha visto que el

cambio producido se explica por la pérdida de materia blanca (Fadda y Rossetti, 1998).

- Cerebelo. Se produce hipometabolismo y atrofia del cerebelo (Cala *et al.*, 1978; Gilman *et al.*, 1990; Davila *et al.*, 1994) que se asocia frecuentemente al alcoholismo (Victor *et al.*, 1971; Torvik *et al.*, 1982; Harper, 1983; Pfefferbaum y Rosebloom, 1993) y se caracteriza clínicamente por ataxia e incoordinación de las extremidades inferiores (Victor *et al.*, 1971). Macroscópicamente hay degeneración neuronal en la porción anterior y superior del vermis cerebeloso, que en muchos casos puede extenderse al lóbulo anterior (Victor *et al.*, 1971; 1989). Harding y colaboradores (1998) vieron que además de disminuir la materia blanca del vermis también lo hacían las zonas intermedia y lateral. Microscópicamente, Phillips y colaboradores, (1987, 1990) encontraron una disminución de la densidad de las células de Purkinge que tienen una distribución espinocerebelar. La pérdida neuronal se correlaciona negativamente con la cantidad de alcohol consumido al día (Harding *et al.*, 1998). La deficiencia de tiamina ha sido implicada en la etiología de la degeneración cerebelar relacionada al alcohol, y esto es reversible con la administración de tiamina (Victor *et al.*, 1989), incluso en presencia de alcohol (Victor *et al.*, 1989). Luego puede afectar al cerebelo funcional y estructuralmente (Fadda y Rossetti, 1998).
- Ganglios basales. No existen evidencias clínicas o anatomopatológicas de que los ganglios basales se dañen en procesos en los que el etanol actúe (Harper y Kril, 1985). Quizás se han visto cambios en el sistema de neurotransmisión (Freund y Ballinger, 1989).
- Locus ceruleus. Está relacionado con la capacidad del organismo para favorecer la adaptación a estímulos inesperados procedentes del medio externo. Cuando se ingiere etanol aumenta la variabilidad en la respuesta de las neuronas del locus ceruleus a sucesos sensoriales procedentes del exterior, lo que conduce a una pérdida de atención disminuyendo la capacidad para producir las respuestas adaptativas apropiadas (Harper, 1998).

La distribución y extensión de la pérdida neuronal depende de la duración, magnitud y modo de exposición al etanol, de la susceptibilidad genética de las especies y la raza de los individuos estudiados. Aunque todavía es difícil definir los niveles de alcohol que causan cambios, se ha sugerido que la retirada de alcohol puede jugar un papel en el daño cerebral (Cavazos *et al.*, 1994).

### 2.5.1. Efectos a Nivel Molecular.

Los mecanismos y factores propuestos que contribuyen a la neurodegeneración no están bien conocidos, por eso se habla de posibles mecanismos moleculares del daño cerebral inducido por etanol. El daño cerebral se puede complicar, como ya se ha visto, con las deficiencias nutricionales y por la presencia de otros daños en páncreas, hígado y corazón (Tarter y Edwards, 1985; Butterworth, 1995).

Pero durante mucho tiempo se ha pensado que la acción del etanol sobre el sistema nervioso se debía casi exclusivamente a una acción inespecífica sobre las membranas celulares. La hipótesis, que surgió para explicar los efectos del etanol en el SNC, sugería que el etanol, como molécula anfipática que es, producía una perturbación física de la matriz lipídica de las membranas neuronales, llevando posiblemente a cambios en la actividad de las proteínas unidas a membrana debido a la existencia de interacciones específicas directas con proteínas neuronales que ven alterada su función (Fadda y Rossetti, 1998). Luego dicha desorganización producida en las membranas altera la funcionalidad de sus componentes proteicos y también lipídicos, aumentando la fluidez de membrana, pero a concentraciones farmacológicamente relevantes el efecto del etanol en la fluidez de la matriz lipídica de las membranas es muy pequeño, a veces indetectable (Sánchez-Amate *et al.*, 1992; 1995; Tabakoff *et al.*, 1996). Como se ha visto anteriormente, al encontrarse entre los componentes proteicos diversos tipos de canales iónicos, proteínas transportadoras o proteínas generadoras de segundos mensajeros entre otras, se pueden producir cambios de distinto tipo (Chin y Goldstein, 1981). No obstante, aunque el alcohol entra a las membranas su distribución no es uniforme, y esto sugiere que el sitio de unión, quizás en la interfase proteína-lípidos, puede justificar la acción del alcohol en dosis moderadas (Tabakoff y Hoffman, 1987; Gonzales y Hoffman, 1991). Así, por ejemplo, la exposición aguda al etanol provoca la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje que, como se sabe, participan en la transmisión del impulso nervioso y en la liberación de neurotransmisores e impide la despolarización celular, ya que altas concentraciones de etanol disminuyen la función de la bomba  $\text{Na}^+$ -ATPasa y la cadena transportadora de electrones, o modifica el metabolismo de muchos neurotransmisores. Esto conduce a nivel celular a una modificación de la funcionalidad de las neuronas y de las redes neuronales en las que estas se encuentran integradas. Como resultado final, se produce una alteración de la actividad cerebral (Carvey, 1998).

Se ha visto un amplio rango de cambios en el déficit funcional y cognitivo relacionados al alcohol con respecto a los receptores (Shanley y Wilce, 1993) y neurotransmisores aminoacídicos (Thomas *et al.*, 1992). El etanol afecta a un amplio número de sistemas de receptores en el rango de concentraciones moderadas. Así, en

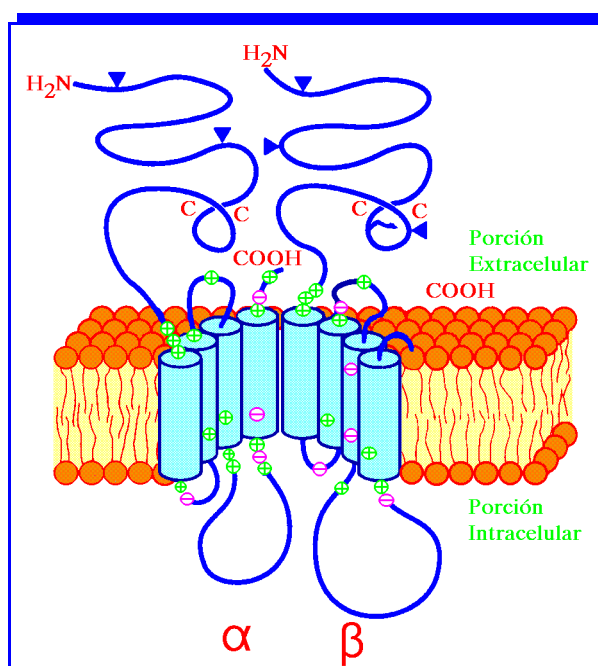
las últimas décadas se han identificado interacciones específicas dosis-dependiente entre el etanol y los sistemas de neurotransmisores más importantes (dopamina (DA), noradrenalina (NA), 5HT, ACh, GABA, Glu y opioides endógenos), al igual que con sistemas de segundos mensajeros, que son muy sensibles a la perturbación por concentraciones de etanol bajas-moderadas. Los efectos farmacológicos del etanol parecen ser la suma de las interacciones con todos estos sistemas. La diferente contribución de cada sistema neurotransmisor así como las variaciones en la dosis/concentración de etanol pueden constituir la base neuroquímica de la dependencia a la dosis de los efectos de comportamiento del etanol. Se ha demostrado que los efectos sedativos, estimulantes, ansiolíticos y de reforzamiento del etanol se dan entre rangos de dosis diferentes y relativamente estrechos (Grant *et al.*, 1990a). Además, a una cierta dosis, un sistema de receptores específico puede ser más prominente que los otros en la contribución a un determinado efecto de comportamiento del etanol (Eckardt *et al.*, 1998).

Más recientemente se ha sugerido que hay proteínas neuronales que son muy sensibles al etanol y han sido llamadas Elementos Receptivos para el Alcohol (ERA) (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997). Entre estos elementos receptivos se encuentran multisubunidades, complejos proteicos unidos a membranas, incluyendo canales iónicos dependientes de ligando y proteínas implicadas en señales neuronales de procesos de transducción (Eckardt *et al.*, 1998).

Algunas de las interacciones más importantes entre el etanol y los sistemas neurotransmisores son las siguientes:

- Sistema GABAérgico. El GABA es un neurotransmisor presente en grandes concentraciones en todo el SNC y también en otros tejidos. Una clase de neuronas inhibitoras lo emplean como neurotransmisor. El etanol potencia la actividad del GABA al actuar sobre sus receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. El complejo del receptor GABA<sub>A</sub> (*figura I.2.6.*) pertenece a la superfamilia de receptores de canales iónicos dependientes de ligando (ionotrópicos), consistente en una proteína formada por cinco subunidades que se asocian formando un canal transmembranal permeable a iones cloruro con diferentes sitios de reconocimiento de ligandos, incluyendo en estos GABA, barbitúricos, benzodiazepinas, alcohol y neuroesteroides (McDonald y Olsen, 1994; Kandel *et al.*, 2001). Y aunque el etanol no se une directamente a los sitios de reconocimiento de estos ligandos (McDonald, 1995), puede potenciar la neurotransmisión mediada por GABA. Cada subunidad de los canales receptor de GABA contiene un gran dominio extracelular N-terminal, donde está el sitio de unión del ligando. Se necesitan dos moléculas de GABA para activar a sus respectivos canales (Kandel *et al.*, 2001). Además

la estimulación del receptor GABA<sub>A</sub> por etanol produce un aumento en la permeabilidad del ión cloruro en la membrana celular produciendo como resultado un incremento del potencial negativo y conduciendo a la hiperpolarización de dicha membrana neuronal, produciéndose así progresivamente ansiolisis, sedación y anestesia; Y esta estimulación que puede producirse por GABA se aumenta por etanol en sinaptosomas y cultivos celulares de cerebro de mamíferos (Nestoros, 1980; Suzdak *et al.*, 1986; Ticku *et al.*, 1986; Allan y Harris, 1987; Celentano *et al.*, 1988; Mehta y Ticku, 1988; Aguayo, 1990; Nishio y Narahashi, 1990; Reynolds y Prasad, 1991). Pero el etanol no estimula el flujo de iones cloruro mediante el receptor GABA de forma ubicua en las diferentes



**Figura I.2.6.** Estructura de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor GABA<sub>A</sub>. El receptor forma un conducto de Cl<sup>-</sup>.

regiones cerebrales (Celentano *et al.*, 1988; Aguayo, 1990; Osmanovic y Shefner, 1990; White *et al.*, 1990; Reynolds y Prasad, 1991; Mihic *et al.*, 1992); Dependiendo de la zona cerebral existe una porción relevante de receptores GABA<sub>A</sub> insensibles a los efectos estimulantes del etanol en el flujo de iones cloruro (Givens y Breese, 1990). La respuesta funcional del canal al GABA y los moduladores depende de las subunidades que compongan el complejo del receptor (Pritchett *et al.*, 1989). Existen varias familias de subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) y cada subunidad puede tener varios subtipos ( $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ) (McDonal y Olsen, 1994), esto hace que varíe la composición de los receptores GABA<sub>A</sub> regionalmente en el cerebro. Esta respuesta regionalmente diferente de los receptores al etanol se debe a la heterogeneidad del complejo de los receptores GABA<sub>A</sub>, en términos de la composición de subunidades (Givens y Breese, 1990). Esto verifica que las subunidades de los receptores son necesarias para la respuesta del receptor al etanol. Esto sucede a concentraciones 1 mM y las acciones del etanol en la

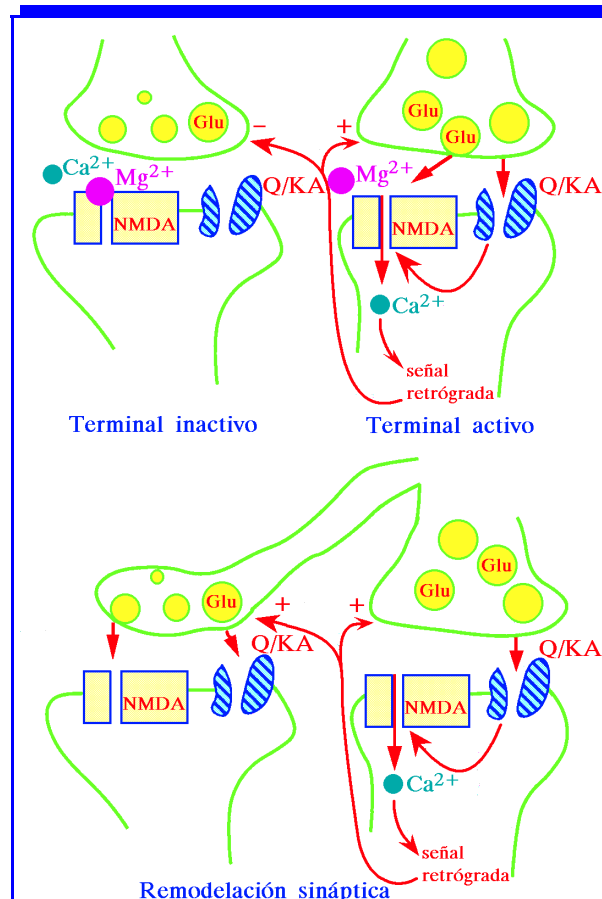
función de los receptores GABA<sub>A</sub> puede dar una base para algunos efectos de comportamiento del etanol cuando se da a dosis bajas-moderadas (0.5 g/kg de etanol en ratas potencian los efectos inhibidores del GABA en la actividad neuronal en la corteza inferior colicular) (Simson *et al.*, 1991a). La función del receptor GABA<sub>A</sub> se regula alostéricamente por agentes de unión a los sitios de estos receptores. El efecto del etanol puede darse directamente sin necesidad de que este neurotransmisor esté unido a su receptor, al contrario de lo que ocurre con otros compuestos como las benzodiazepinas. Esto podría estar relacionado con la mayor toxicidad y el aumento del número de acciones secundarias del etanol. Que el etanol afecta la neurotransmisión GABAérgica se demuestra al ver que los alcohólicos crónicos tienen niveles reducidos de GABA en plasma y que al morir presentan en su cerebro un número incrementado de receptores de GABA. En cualquier caso, no se conocen las sustancias endógenas que utilizan estos sitios del receptor GABA<sub>A</sub>. Esta acción del etanol sobre la neurotransmisión GABAérgica podría ser la responsable de sus efectos sedantes, hipnóticos y supresores del sueño REM, (movimiento rápido de los ojos) sus propiedades anticonvulsivas y su capacidad de inducir amnesia retrógrada. Además, así se explican los efectos depresivos sinérgicos y aditivos que ocurren cuando el etanol y las benzodiazepinas se administran juntos. Por otro lado, el etanol puede bloquear los flujos de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje a través de las membranas celulares, reduciendo la liberación de varios transmisores del SNC deprimiendo así, como antes se ha mencionado, la excitabilidad neuronal. Esto puede aumentar la acción del GABA sobre sus receptores. Wan y colaboradores (1996) sugieren que el receptor GABA<sub>B</sub> tiene un papel en la modulación de la interacción entre el etanol y el receptor GABA<sub>A</sub>. El receptor GABA<sub>B</sub> es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G que se cree que regula la actividad de los canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, aumentando la permeabilidad del K<sup>+</sup> o inhibiendo el canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje, y modula la actividad de la adenilato ciclasa (Kandel *et al.*, 2001). Los receptores GABA<sub>B</sub> se localizan principalmente en regiones presinápticas y su actividad disminuye la liberación de GABA (Misgeld *et al.*, 1995). Wan y colaboradores (1996) demostraron que el bloqueo farmacológico del receptor GABA<sub>B</sub> descubre el incremento inducido por etanol de la función del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo de roedores. Los resultados obtenidos demuestran que algunos efectos del etanol en los receptores GABA<sub>A</sub> del hipocampo pueden necesitar un bloqueo de los receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos (Eckardt *et al.*, 1998).

- Sistema de los aminoácidos excitatorios. La acción excitadora del Glu disminuye al actuar el etanol sobre dos de sus receptores, los denominados

NMDA y no NMDA. Ejemplos de estos últimos son el KA (kainato) y el AMPA (ácido  $\alpha$ -N-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico). Siendo el NMDA considerado como el más sensible a los efectos del etanol (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989). El receptor NMDA es un complejo macromolecular análogo al GABA<sub>A</sub>, es un canal catiónico permeable a Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> con varios sitios farmacológicamente claros en la proteína receptora que también modulan el paso de iones por este canal. Estos sitios incluyen el lugar de reconocimiento del NMDA y Glu, el sitio de unión de la Gly<sub>2</sub>, un sitio que une compuestos como la penicilina, un sitio de unión de Mg<sup>2+</sup> dependiente de voltaje y un sitio modulador que une Zn<sup>2+</sup> (Mori y Mishina, 1995). Cuando el Glu se une a su receptor NMDA, se abre un canal de Ca<sup>2+</sup> que en condiciones normales permanece bloqueado por Mg<sup>2+</sup>. Este ión se separa del canal sólo cuando el Glu activa a otro tipo de receptor para Glu, presente en la misma terminal postsináptica, como por ejemplo el KA. Luego el etanol también afecta la función de receptores Glu ionotrópicos (no-NMDA). Aunque estudios iniciales demostraron que el receptor NMDA era el más sensible a la acción del etanol (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989), esto varía al cambiar las condiciones del experimento. Estudios recientes demuestran que la sensibilidad de otros receptores de Glu, como el receptor KA, a la inhibición por etanol es mayor si se usan bajas concentraciones de agonistas (Snell *et al.*, 1994b; Dildy-Mayfield y Harris, 1994a,b) y por lo tanto según la concentración de agonistas los receptores NMDA o no-NMDA pueden ser sensibles a la inhibición por etanol. El receptor NMDA es un conjunto de subunidades, que según el área neuroanatómica del cerebro donde se encuentre tendrá diferente sensibilidad al etanol (Tabakoff y Hoffman, 1996b) y esto se relaciona con las subunidades que componen el receptor, aunque la influencia, según otros estudios, no es muy grande (Tabakoff y Hoffman, 1996b). Existen evidencias de que los receptores que contienen la subunidad NR2B son más sensibles a la inhibición por etanol (Lovinger, 1995; Yang *et al.*, 1996), aunque en trabajos recientes se sugiere que otros factores además de la composición de subunidades *per se* puede contribuir significativamente a dicha sensibilidad a la inhibición por concentraciones de etanol bajas-moderadas en los receptores NMDA de determinadas regiones cerebrales o tipos celulares. Estos factores pueden ser la influencia de otros moduladores de la función del receptor como la Gly (Rabe y Tabakoff, 1990; Snell *et al.*, 1994a, b; Bhave *et al.*, 1999) y/o la modificación posttranslacional por fosforilación mediada por la proteína quinasa C (PKC). Algunos autores demostraron que el etanol es antagonista selectivo del paso de cationes que va asociado a la estimulación de los receptores NMDA *in vitro* (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989). La corriente de iones estimulada por NMDA se inhibe

por etanol en células del hipocampo dependientes de voltaje. Este efecto del etanol tiene un umbral bajo que además es dependiente de concentración (Lovinger *et al.*, 1989). Otro estudio demostró que el etanol a bajas concentraciones disminuye la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por NMDA (Tabakoff y Von Wartburg, 1975) y produce guanosin-monofosfato cíclico (GMPc) (Hoffman *et al.*, 1989). Estos y otros estudios (White *et al.*, 1990; Dildy-Mayfield y Leslie, 1989;1991; Lovinger *et al.*, 1990) han demostrado la capacidad del etanol para ser antagonista de la liberación de neurotransmisores estimulada por NMDA (Göthert y Fink, 1989; Gonzales y Woodward, 1990; Woodward y Gonzales, 1990; Simson *et al.*, 1991b; Fink *et al.*, 1992; Woodward, 1994). La activación del receptor de Glu puede contribuir a la producción de diversos cambios en la plasticidad sináptica, entre los que se incluyen la aparición y desaparición de contactos sinápticos (figura I.2.7.), y que pueden conducir a diversas modificaciones de conducta. Por

ejemplo, en el cerebro adulto, la estimulación repetida del receptor NMDA produce un aumento en la eficacia de actuación de la sinapsis, que permanece en el cerebro durante largos periodos de tiempo, y que se conoce como potenciación a largo plazo. Se trata de un proceso relacionado con el aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado que exposiciones agudas del tejido del sistema nervioso a bajas concentraciones de etanol (5-10 mM) inhibe la sensibilidad de las neuronas del hipocampo y de las de Purkinje a



**Figura I.2.7.** Esquema de la actuación del receptor NMDA y cambios en su plasticidad neuronal.

la actuación del Glu. Esto sugiere que el antagonismo de la conductancia iónica mediada por NMDA puede contribuir a algunos de los efectos fisiológicos o de conducta del etanol así como a la pérdida de memoria producida por el etanol o a la producción de convulsiones que a veces acompañan a la abstinencia de alcohol. Hay otros datos que muestran como a pesar de las bajas concentraciones de etanol se aumenta la respuesta del NMDA en el hipocampo (Lima-Landman y Albuquerque, 1989); el tratamiento crónico con alcohol produce un aumento del número de receptores NMDA y de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que podría aumentar la excitabilidad neuronal. Luego cuando se toma alcohol por primera vez o de una forma esporádica, disminuye la actividad NMDA, mientras que tras la administración crónica aumenta la actividad de estos receptores. Estos datos podrían explicar la hiperactividad producida al dejar de tomar alcohol. Los cambios antes indicados sobre la actividad de los receptores NMDA, después de un consumo prolongado de alcohol, corroboran la hipótesis de que el organismo intenta contrarrestar los efectos producidos en las etapas iniciales de su consumo. El aumento de la actividad NMDA y del número de canales de  $Ca^{2+}$ , está enmascarado por la presencia de etanol. Al quedar libres tras la retirada de este último, presentan una actividad que es superior a la existente en una situación normal. Las deficiencias nutricionales (deficiencias en tiamina) y la hiperexcitabilidad de la retirada pueden tener en común un mecanismo molecular de neurotoxicidad unido a la neurotransmisión glutamatérgica aumentada y a la sobreactivación de los receptores NMDA y excitotoxicidad. Y es que la retirada aumenta la neurotransmisión glutamatérgica y por tanto el Glu extracelular (Rossetti y Carboni, 1995), que produce alteraciones neuroadaptativas (Collins *et al.*, 1996) que vienen de la mano de la sobreactivación de los receptores de Glu NMDA (Coile y Puttfarcken, 1993; Lipton y Rosenberg, 1994).

- Sistema peptidérgico. El etanol también tiene afinidad por los receptores  $\delta$ -opiáceos. Más aún, el metabolito del alcohol, acetaldehído, puede unirse con las catecolaminas para formar unos conjugados denominados tetrahidroisoquinolonas y salsolinol, que tienen funciones semejantes a las de los péptidos opiáceos. Las propiedades de refuerzo del etanol, así como otros efectos cuando está en dosis bajas-moderadas, son mediados por la activación del sistema peptidérgico (Froehlich y Li, 1994). Además, estudios recientes han revelado la implicación del sistema peptidérgico en el control de la estimulación inducida por etanol de la neurotransmisión de DA. Estos compuestos también pueden contribuir a los efectos neurodegenerativos del etanol, que causan pérdidas del tejido neuronal, déficit de memoria,

disminución de la agudeza mental o deterioro motor permanente (Collins, 1982). Los efectos agudos de estos también contribuirían a las propiedades analgésicas, euforizantes y sedativas-hipnóticas del etanol. La actividad motora producida por etanol en ratones tiene una influencia genética importante (Phillips *et al.*, 1995). Dicha actividad, tras dosis agudas de etanol, puede implicar la activación del sistema dopaminérgico y peptidérgico. Antagonistas selectivos del receptor de DA bloquean la actividad motora producida por el etanol (Koechling *et al.*, 1990; Broadbent *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1995).

- Sistema catecolaminérgico. Aunque el etanol es un depresor del SNC, su administración aguda provoca la liberación de DA y NA. La liberación de estas catecolaminas contribuye a la acción eufórizante del etanol y su capacidad de inducir dependencia, aunque no está muy clara la acción del sistema noradrenérgico. Cuando se habla de los determinantes neuroquímicos y neuroanatómicos del placer o refuerzo, tienen importancia el sistema dopaminérgico y serotoninérgico del cerebro. Existen evidencias que sugieren que el sistema dopaminérgico mesolímbico media, al menos en parte, las propiedades de refuerzo del etanol (Koob, 1992; Wise 1996). El etanol, además de interactuar con los receptores GABA<sub>A</sub> y NMDA, interactúa con la DA (Deitrich *et al.*, 1989; Grant 1994, Samson y Hodge 1996): la administración de etanol se ha demostrado que aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Mereu *et al.*, 1984; Gessa *et al.*, 1985) y la liberación de DA de estas neuronas (Carlsson y Lindquist 1973; Imperato y Di Chiara 1986). También se ha visto que la retirada de etanol va a disminuir esta actividad dopaminérgica (Diana *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996). Por lo tanto, el sistema dopaminérgico mesolímbico es el mayor candidato para regular las propiedades de refuerzo de las drogas adictivas, incluyendo el etanol, en animales de experimentación y humanos (Koob, 1992; Wise, 1996; Kiyatkin, 1995). Existen estudios que demuestran que la liberación de DA, al estimular con etanol afecta al núcleo caudado, aunque este área del cerebro tiene un umbral mayor para el etanol con el fin de estimular la liberación de DA que en el núcleo accumbens (AC) (Imperato y Di Chiara 1986) donde el bloqueo de la liberación de DA lo hace la  $\gamma$ -butirolactona. El sistema dopaminérgico mesocortical surge del área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo y se proyecta a la corteza prefrontal (Björklund y Lindvall, 1984; Goldman-Rakic, 1987). Se ha prestado mucha atención a la corteza prefrontal ya que esta región está implicada en funciones de motivación, cognitivas, etc. (Bartus *et al.*, 1978; Brozoski *et al.*, 1979; Goldman-Rakic y Brown, 1981; Goldman-Rakic, 1987; Wenk *et al.*, 1989). Las neuronas piramidales de la corteza cerebelar forman la base celular para

trabajar la memoria y la DA puede modular las funciones cognitivas mediadas por la actividad de la corteza prefrontal (Dolan *et al.*, 1995; Okubo *et al.*, 1997). Luego las alteraciones de la transmisión dopaminérgica son importantes en el déficit cognitivo mediado por dicha corteza prefrontal en la dependencia al etanol. Como ya se ha visto anteriormente, las alteraciones del sistema noradrenérgico respecto al etanol no están bien estudiadas, lo que si se ha demostrado es que existe una pérdida significativa de neuronas en el locus ceruleus (Mayes *et al.*, 1988; Victor *et al.*, 1989) disminuyendo el nivel de NA (Carlsson *et al.*, 1980).

- Sistema indolaminérgico. Se sabe que el etanol estimula el aumento de la actividad serotoninérgica a través de sus receptores 5HT<sub>3</sub>, que son activados por ligando. Estos receptores ionotrópicos tienen cuatro segmentos transmembrana que son estructuralmente parecidos a los receptores de la ACh. Estos son permeables a cationes monovalentes y se piensa que participan en la transmisión sináptica excitadora rápida en algunas áreas cerebrales (Kandel *et al.*, 2001). El sistema de la 5HT en el cerebro juega un papel importante mediando los efectos del etanol cuando está en dosis bajas-moderadas. De acuerdo a la relación entre el funcionamiento de la 5HT cerebral y el consumo de etanol, se han encontrado agentes capaces de inhibir la recaptura de 5HT, aumentando la concentración de esta en la hendidura sináptica. Teniendo en cuenta los efectos directos del etanol en la función del receptor serotoninérgico, concentraciones bajas-moderadas de etanol tienen poco efecto en la interacción de la 5HT con varios subtipos de receptores neuronales, 5HT<sub>1</sub> o 5HT<sub>2</sub> (Buckholtz *et al.*, 1989). Otros estudios indican la existencia de una interacción del etanol con el subtipo 5HT<sub>3</sub>. Entre los diferentes subtipos de receptores de 5HT (Peroutka, 1993), este receptor 5HT<sub>3</sub> es el único unido a un canal iónico y se localiza primeramente en regiones mesolímbicas del cerebro (Kilpatrick *et al.*, 1987). La acción del etanol en el receptor 5HT<sub>3</sub> depende de la concentración de 5HT existente y se bloquea con la aplicación de antagonistas específicos de receptor que bloquean la acción del etanol (Lovinger, 1991; Lovinger y White, 1991). Estos datos podrían sugerir la interacción entre el etanol y el sitio de reconocimiento de la 5HT; Además el etanol no altera la unión al receptor 5HT<sub>3</sub>, quedando el interrogante de cuál es el mecanismo por el que el etanol interacciona con el receptor 5HT<sub>3</sub> para aumentar la respuesta de la 5HT. Otros estudios han demostrado que la interacción funcional entre los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos pueden jugar un papel importante en el incremento de la liberación de DA en diferentes áreas cerebrales como el AC. Dicha interacción también puede sugerir el mecanismo por el que la 5HT media las propiedades de refuerzo del etanol, debido a que el sistema dopaminérgico-

mesolímbico, que inerva al AC, está claramente unido a los efectos de reforzamiento de un número de drogas adictivas (Carboni *et al.*, 1989; Wozniak *et al.*, 1990). Con la hipótesis del papel del receptor 5HT<sub>3</sub> en la mediación de las acciones del etanol en las neuronas dopaminérgicas, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores 5HT<sub>3</sub> por antagonistas selectivos reduce voluntariamente la ingesta de etanol (Costall *et al.*, 1990; Fadda *et al.*, 1991b; Kostowski *et al.*, 1993; Tomkins *et al.*, 1995). El sistema serotoninérgico surge principalmente del núcleo de Rafe medio y dorsal, proyectándose principalmente a la corteza, sistema límbico e hipotálamo (Jacobs y Azmitia, 1992).

- Sistema colinérgico. El etanol disminuye la liberación de ACh en la formación reticular produciendo sedación y delirio. Las neuronas colinérgicas son el blanco del etanol en el cerebro (Massarelli, 1979). Otros autores han demostrado que el etanol aumenta la liberación de ACh en la unión neuromuscular acompañándose de un incremento en los potenciales miniatura mediado por la actividad de los receptores colinérgicos nicotínicos que llevan acoplados los canales iónicos. Aracava y colaboradores (1991) mostraron que existía un aumento inducido por etanol en la frecuencia de apertura de los canales simples cuando estos eran activados por ACh. El sistema colinérgico central es parte importante del circuito neuronal de la memoria, el aprendizaje y la percepción. La mayor fuente de ACh en el cerebro viene de los núcleos del cerebro basal, y se proyecta hacia diferentes regiones cerebrales (Saper, 1987). El núcleo septal medial se proyecta del hipocampo principalmente por el fórnix; la banda diagonal de Broca se proyecta al hipocampo, al bulbo olfatorio y a la corteza límbica; y el núcleo basal de Meynert se proyecta hacia las cortezas frontal, parietal y temporal. En pacientes con el SWK, hay una pérdida significativa de neuronas en los núcleos basales y una reducción de la actividad acetilcolintransferasa en el neocortex y el hipocampo (Arendt *et al.*, 1983; Nordberg *et al.*, 1983).
- Otro ejemplo de las alteraciones moleculares producidas a lo largo de la exposición al etanol es la variación de la actividad de la adenilato ciclasa cerebral. Al principio de su administración, el alcohol la activa, con lo que aumentan los niveles de adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) pero tras la exposición crónica se reduce la actividad enzimática. Se ha demostrado que el etanol no solo tiene efectos en los sistemas neurotransmisores que modulan su actividad adenilato ciclasa sino que también, tiene efectos directos en los componentes del sistema de transducción de señales de esta enzima, que sirven para afectar las interacciones entre varios neurotransmisores y regular los niveles neuronales de AMPC. La adición de etanol en forma aguda a las

células o a preparados de membranas celulares lleva al aumento de la actividad de agonistas de la adenilato ciclasa. Existen nueve isoformas de esta enzima que muestran diferente sensibilidad al efecto estimulador del etanol, el tipo más sensible es la isoforma VII (Yoshimura y Tabakoff, 1995). Se ha sugerido que la proteína G estimuladora (Gs) está implicada en la acción del etanol (Tabakoff y Hoffman, 1998) debido a que la actividad de la adenilato ciclasa está modulada por receptores acoplados a proteínas G. La acción del etanol puede estar mediada en parte por la activación de la proteína Gs, y esta acción del etanol parece promover la interacción de la proteína G con la parte catalítica de la adenilato ciclasa, siendo la magnitud del efecto dependiente de la isoforma que exista en la célula. Estos datos sugieren que la actividad de este enzima en diferentes tejidos y regiones cerebrales puede ser estimulada sustancialmente por concentraciones de etanol bajas-moderadas, dependiendo de la isoforma expresada en ese tejido (Yoshimura y Tabakoff, 1995). Esta enzima genera AMPc, que es un segundo mensajero distribuido en casi todas las células del organismo incluyendo el SNC. La estimulación en la producción del AMPc en el cerebro por el etanol probablemente se afecte por un gran número de neurotransmisores, pero la magnitud del efecto del etanol variará dependiendo de la expresión local de las diferentes isoformas de la adenilato ciclasa. La interacción del etanol con el sistema generador de AMPc ha sido implicado en el desarrollo de la tolerancia (Szabó *et al.*, 1988a; Tabakoff y Hoffman, 1998). Además la acción neuroquímica de dosis de etanol bajas-moderadas sobre la actividad de la adenilato ciclasa da una visión neuroadaptativa en el SNC (Eckardt *et al.*, 1998).

Si resumimos los datos de los efectos neuroquímicos del etanol (>20 mM), se aprecia que un sistema importante de neurotransmisores, que puede ser caracterizado como un canal iónico dependiente de receptor, es importante para mediar los efectos de tales concentraciones de etanol. Ejemplos son el receptor GABA<sub>A</sub>, el NMDA y posiblemente otros receptores de Glu, los receptores colinérgicos nicotínicos y los receptores de 5HT<sub>3</sub>. Las señales de transducción tales como aquellas que están implicadas en la adenilato ciclasa y la PKC también ejercen una contribución importante. La actividad de neuronas dopaminérgicas, principalmente las mesolímbicas, parecen ser particularmente sensibles a la acción del etanol, pero cambios en la actividad neuronal dopaminérgica inducidos por etanol pueden implicar acciones del etanol en otros sistemas neurotransmisores, como el serotoninérgico, peptidérgico y colinérgico. El sistema de transducción de señales que genera AMPc puede alterarse por niveles moderados de etanol y puede participar en ciertas acciones agudas del etanol, pero esto puede participar también en las consecuencias neuroadaptativas (tolerancia) de la ingesta de etanol (Eckardt *et al.*, 1998).

## **2.6. ALCOHOL ETÍLICO Y NEURODEGENERACIÓN.**

### **2.6.1. Cambios Estructurales y Funcionales.**

Desde hace tiempo se conoce que la ingesta de etanol de forma crónica va asociada a procesos neurodegenerativos en regiones específicas del cerebro (Walker y Freund, 1971; 1973; Freund, 1973; Walker *et al.*, 1980a,b). En humanos, los cambios morfológicos, neurofisiológicos y bioquímicos en el SNC se asocian a un déficit cognitivo, que a su vez va asociado a desórdenes mentales (Victor y Yakovlev, 1955; Lynch, 1960; Meissner, 1968; Victor *et al.*, 1971; 1989; Freund, 1973; Smith *et al.*, 1985; Eckardt y Martin, 1986; Martin *et al.*, 1986). Como ya se ha visto, estos desórdenes mentales, debidos a la ingesta de etanol, se conocen como el SWK, caracterizado por el daño en la memoria y otras funciones cognitivas (Jacobson *et al.*, 1990). Las alteraciones neuropatológicas se consideran la causa de los daños en procesos de memoria y aprendizaje y de las modificaciones de la neurotransmisión monoaminérgica (McEntee y Mair, 1990) y/o colinérgica (Beracochea y Jaffard, 1985; Beracochea *et al.*, 1986; 1987; Arendt *et al.*, 1988a,b; 1989; Hodges *et al.*, 1991; Melis *et al.*, 1996). Las alteraciones neuropatológicas que se dan en regiones corticales e hipocampo son frecuentes tras el tratamiento con dosis altas y tóxicas de etanol en roedores (Zou *et al.*, 1996). Una de las estructuras cerebrales implicadas en la función de la memoria es el hipocampo, donde se generan cambios funcionales y estructurales con la administración crónica del etanol, debido a que su inervación aferente desde la zona basal del cerebro es vulnerable a dicho efecto del etanol crónico. En el hipocampo existen neuronas más susceptibles que otras a dichos efectos del etanol aunque se desconocen las razones. El desarrollo de los cambios estructurales es paralelo al déficit cognitivo y depende de la duración y de la cantidad de etanol ingerido (Walker *et al.*, 1980b).

Por otro lado, la administración de etanol crónico en roedores produce una pérdida de neuronas colinérgicas de la zona basal. La pérdida de neuronas en esta región es más pronunciada en el septo medial y en el núcleo de la banda diagonal que en el núcleo basal (Arendt *et al.*, 1988b). El núcleo basal inerva al neocortex, mientras que la vía septohipocampal colinérgica termina aproximadamente en la capa piramidal o granular y en varios segmentos dendríticos del hipocampo, modulando su actividad (Mesulam *et al.*, 1983). La neurodegeneración de estas vías colinérgicas altera la función de las estructuras inervadas. Las alteraciones de la morfología del hipocampo tras la exposición al etanol se asocian a cambios funcionales, como son la reducción de procesos inhibitorios (Abraham *et al.*, 1981; Durand y Carlen, 1984a; Rogers y Hunter, 1992), alteración de la plasticidad sináptica y daño de la potenciación a largo plazo en el giro dentado (Abraham *et al.*, 1984; Durand y Carlen, 1984b). La reducción de los procesos inhibitorios ha sido atribuida a un daño en las interneuronas GABAérgicas (Lescaudron *et al.*, 1986) o a una reducción de la

---

modulación inhibitoria por las interneuronas colinérgicas (Rothberg *et al.*, 1993). El desarrollo del daño neuronal inducido por etanol se asocia a daños en la memoria (Arendt *et al.*, 1987; 1988b), así el daño de neuronas de la vía septohipocampal colinérgica, la destrucción de las proyecciones a fimbria fornix produce un daño en la memoria indicando que la integridad de este circuito es necesaria para la formación de la memoria (Olton *et al.*, 1979; Will y Heifti, 1985; Hagan *et al.*, 1988). El daño en procesos de memoria asociado a la intoxicación crónica con etanol viene junto con el daño de los núcleos colinérgicos (Fadda y Rossetti, 1998).

### 2.6.2. Neurodegeneración y Tratamiento Crónico con Etanol.

Aunque el daño neuronal se correlaciona con la cantidad total de etanol administrada, la forma de darlo es un factor importante en el desarrollo de los desórdenes neurodegenerativos, a veces pequeñas cantidades pueden ser más dañinas que grandes dosis. La intoxicación de etanol puede llevar directamente a la degeneración neuronal, un proceso que no se impide aún cesando la administración de etanol (Phillips y Cragg, 1983), ya que la reacción de retirada del etanol es suficiente para empezar y desarrollar la degeneración neuronal ya que se ha sabido que el efecto producido por la retirada del etanol es más dañino para las neuronas que continuar con la administración de etanol. Por lo que la fase de retirada es suficiente para causar cambios neurodegenerativos en regiones corticales (Collins *et al.*, 1976; Zou *et al.*, 1996). Veatch y Gonzales (1996) vieron que la forma de desarrollarse este proceso iba desde el hipocampo a otras áreas cerebrales.

Para detectar las áreas implicadas y afectadas por el etanol se ha usado la expresión de genes neuronales activados por el incremento en la excitación (genes tempranos inmediatos). La presencia de neuronas excitadas se puede detectar por la presencia de sus productos proteicos; La presencia de la proteína Fos se considera un marcador celular de la activación neuronal (Sagar *et al.*, 1988; Dragunow y Faull, 1989; Morgan y Curran, 1989) inducido por estímulos fisiológicos y farmacológicos (Curran y Morgan, 1985; Dragunov y Robertson, 1987; Morgan *et al.*, 1988). La aplicación de agonistas exógenos del Glu, NMDA especialmente, ha mostrado el aumento de la expresión de la proteína Fos (Cole *et al.*, 1989; Sonnenberg *et al.*, 1989; Aronin *et al.*, 1991). La expresión del gen *c-fos* ha sido utilizada para mapear los caminos sensibles al etanol en el cerebro (Davidson *et al.*, 1996) y la excitación neuronal durante el síndrome de retirada (Matsumoto *et al.*, 1993a,b) y mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha visto que la proteína fos aumenta primero en la corteza frontal y luego se extiende al hipocampo tras la retirada (Bouchenafa y Littelton, 1993). Al producirse excitación eléctrica *ex vivo* en el hipocampo tras la retirada aumenta la actividad neuronal y por tanto aumenta la expresión del gen *c-fos*, pero esta activación neuronal puede disminuir por los antagonistas del receptor

NMDA (Morgan *et al.*, 1991). Los cambios inducidos por el etanol en la expresión de la proteína Fos han sido mapeados en diferentes áreas del cerebro (Ryabinin *et al.*, 1997) y se ha visto que los efectos producidos por el tratamiento crónico de etanol se dan específicamente en determinadas regiones del cerebro (Fadda y Rossetti, 1998).

### **2.6.3. Cambios Neuroquímicos en la Función de la Memoria.**

El efecto del etanol crónico en tres neurotransmisores amina, NA, DA y 5HT<sub>3</sub>, ha sido muy estudiado en animales (Hunt y Majchrowicz, 1974; Fadda y Gessa, 1985; Hoffman y Tabakoff, 1985; Deitrich *et al.*, 1989; Nutt y Glue, 1990; Little, 1991; Littleton y Little, 1994; Tabakoff y Hoffman, 1996a; Tabakoff *et al.*, 1996; Diamond y Gordon, 1997). La producción de monoaminas aumenta con administraciones agudas y cortas de etanol (Hoffman y Tabakoff, 1985), pero con tratamientos prolongados la concentración de monoaminas en el cerebro disminuye; Los cambios observados total o parcialmente reversibles o persistentes, según la duración del tratamiento (Gursey y Olson, 1960; Carlsson *et al.*, 1973; Hunt y Majchrowicz, 1974; Rawat, 1974; Yamanaka y Kono, 1974; Arendt *et al.*, 1989; Hodges *et al.*, 1991).

La corteza prefrontal tiene un papel importante en las funciones cognitivas, ya que recibe una proyección dopaminérgica del VTA (Bjorklund y Lindvall, 1984) y los cambios en funciones dopaminérgicas se asocian a las alteraciones en funciones cognitivas en humanos y animales (Brozoski *et al.*, 1979; Goldman-Rakic, 1987; Gotham *et al.*, 1988; Wenk *et al.*, 1989; Sawaguchi y Goldman-Rakic, 1991). Si no se da la regulación de la actividad dopaminérgica de esta región cerebral puede producirse daños cognitivos en varios desórdenes psiquiátricos (Murphy *et al.*, 1996). Y como el alcohol produce variaciones en la transmisión DA en la corteza prefrontal (Fadda *et al.*, 1989) por eso se asocia a alteraciones cognitivas (Fadda y Rossetti, 1998).

La neurotransmisión colinérgica se daña por el consumo de etanol (Arendt *et al.*, 1988b; Beracochea *et al.*, 1986; 1992; Hodges *et al.*, 1991; Melis *et al.*, 1996) y por tanto se produce un daño en la memoria y el aprendizaje que disminuye la neurotransmisión de ACh. Aunque hay experimentos que muestran un modelo bifásico en la liberación de ACh, tras la administración de etanol la liberación de ACh en el hipocampo es muy alta seguida de un descenso, y aunque esto no está bien estudiado es posible que este efecto vaya asociado al efecto bifásico de la memoria, en efecto bajas dosis de etanol en sujetos normales mejora la memoria para eventos que se dieron antes de beber (Parker *et al.*, 1981).

Estos déficits de memoria son aliviados por la administración de un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) (Beracoechea *et al.*, 1986). Otros estudios han demostrado que el etanol crónico induce una reducción de marcadores de la función colinérgica (como la reducción en la captura de colina, una disminución en la síntesis, almacenamiento y liberación de ACh y también la disminución de la actividad aciltransferasa) y un daño en el rendimiento de la memoria (Arendt *et al.*, 1988a,b; 1989; Hodges *et al.*, 1991). Además el daño del rendimiento de la memoria por etanol crónico lleva a la reducción de la neurotransmisión de ACh y el decline en la liberación de ACh se asocia al daño de la memoria, cambios inducidos por el etanol en la neurotransmisión colinérgica se asocian a daños de la memoria (Fadda y Rossetti, 1998).

## **2.7. TOLERANCIA.**

### **2.7.1. Mecanismo de Tolerancia.**

El mecanismo parece ser relevante en el desarrollo de la dependencia al etanol en humanos, en los que la baja sensibilidad a los efectos aversivos del etanol aumentan la posibilidad de convertirse en un alcohólico y que la sensibilidad reducida a los efectos aversivos del alcohol no se debe a la tolerancia farmacocinética (Shuckit, 1984; 1985). Se especula que el desarrollo de la tolerancia, seguido de la ingesta de etanol, puede reflejar algunos cambios neuroadaptativos en el cerebro que pueden llevar en última instancia a la dependencia (Koob, 1996; Schulteis y Koob, 1996; Koob y Le Moal, 1997).

El uso prolongado de etanol origina un cambio de la capacidad de consumo, como resultado de un aumento de la capacidad de metabolización. El uso crónico de alcohol produce también tolerancia farmacodinámica, necesitando mayores concentraciones plasmáticas para producir intoxicación (Fadda y Rossetti, 1998). En términos farmacológicos, tolerancia puede ser definida como el aumento de la dosis de la droga para producir el mismo efecto. Considerando los múltiples efectos del etanol en el cerebro y la plasticidad de las respuestas biológicas en los niveles de organización, la tolerancia podría ser consecuencia de los cambios en cualquiera de los múltiples mecanismos que suceden entre la administración de la droga y la aparición de sus efectos farmacológicos. Además, se puede medir fácilmente la respuesta reducida a una droga seguida de la administración repetida de etanol, el desarrollo de la tolerancia es un suceso complejo que implica diferentes mecanismos como son los cambios en la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Kalant *et al.*, 1971; Cederbaum *et al.*, 1977; Lê y Khanna, 1989), cambios a nivel celular y subcelular (Kalan *et al.*, 1971; Tabakoff *et al.*, 1982) y cambios debidos a los efectos producidos por la droga, el etanol, en el sistema neuronal (Stewart y Badiam, 1993).

Luego la tolerancia es un proceso metabólico en el que el sistema MEOS, y más el enzima hepático ADH, se induce con la ingesta crónica de etanol (Goldstein *et al.*, 1974; Browman y Rand, 1980); adaptación funcional (Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994) que acompaña al abuso de altas dosis de alcohol (Ashton, 1992). Y esta tolerancia metabólica no es tan importante como la tolerancia tisular que es la responsable de que el individuo deba ingerir más cada vez. Este mecanismo es doble (Goldstein *et al.*, 1974; Browman y Rand, 1980) ya que aumenta la biotransformación del alcohol por inducción enzimática y además se da una tolerancia celular verdadera en el SNC, habiendo adquirido las células la propiedad de funcionar más eficazmente a una concentración mayor de etanol (Browman y Rand, 1980), siendo este último fenómeno el esencial (Browman y Rand, 1980; Litter, 1988).

Se ha sugerido que la tolerancia al etanol puede venir por dos mecanismos no excluyentes (Littleton y Little, 1994; Koob 1996):

·Habitación: Se reduce la intensidad del estímulo inicial de la droga (Poulos y Cappell, 1991). La administración repetitiva de etanol produce, por un lado, el desarrollo de la tolerancia (habitación) a sus efectos depresores y, por otro lado, desarrolla la sensibilización de los efectos que activan el sistema motor (Masur y Boerngen, 1980). Además no existen evidencias de que la tolerancia o habitación desarrollen los efectos remuneradores del etanol, a pesar de que las propiedades remuneradoras del etanol se consideran uno de los mayores determinantes de la ingesta del etanol (Amit y Brown, 1982; Imperato y Di Chiara, 1986; Koob, 1992; Samson y Harris, 1992). Parece ser que la teoría de la habitación no proporciona los datos adecuados de la tolerancia al etanol (Fadda y Rossetti, 1998).

·Adaptación homeostática: Proceso contrario al efecto de la droga en los sustratos neurobiológicos inicialmente afectados por etanol (Poulos y Cappell, 1991). El concepto de dependencia como neuroadaptación fue propuesto originalmente por Himmelsbach (1941) y puede ser considerado una adaptación del concepto de homeostasis a la aplicación a la dependencia de las drogas. Los efectos agudos iniciales de la droga son contrarios por cambios homeostáticos a los sistemas que median los efectos primarios de la droga, haciéndolos progresivamente menos efectivos y llevando a la tolerancia. La rápida eliminación de la droga enmascara el estado de adaptación causando cambios en la dirección contraria a la producción por la droga (síndrome de retirada). En este modelo, tolerancia y dependencia están casualmente unidas e implicadas en el desarrollo de los procesos neuroadaptativos ocurridos en los mismos sustratos neurobiológicos afectados por la droga, el etanol (Solomon y Corbit, 1974; Solomon, 1980; Koob *et al.*, 1994; Schulteis y Koob, 1996; Koob y Le Moal, 1997). Sigue en estudio el hecho de que la tolerancia a los efectos

del etanol se asocie a la elaboración de procesos neuroadaptativos que se oponen a los efectos agudos de la droga para mantener la homeostasis cerebral y que esto se manifieste como la sintomatología producida por la retirada (Fadda y Rossetti, 1998).

Existen diferentes formas de tolerancia desarrolladas bajo distintas condiciones o regímenes de administración de etanol (Tabakoff *et al.*, 1982; Kalant, 1989; Pohorecky y Roberts, 1991; 1992). Las condiciones específicas a las que los animales se exponen al etanol determina los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la tolerancia que predominará. Intoxicaciones continuas o altas dosis en intervalos cortos son necesarias para desarrollar la tolerancia celular, donde bajas dosis en un régimen repetitivo (tolerancia crónica) o una sola dosis (tolerancia aguda) son suficientes para desarrollar la tolerancia a los efectos de comportamiento del etanol (daño motor, hipotermia, etc.). La tolerancia tras altas dosis se desarrolla a bajos índices y va desapareciendo tras la interrupción del tratamiento, al contrario que la tolerancia tras bajas dosis que puede desarrollar incluso con una sola administración (tolerancia aguda) y dura semanas tras administrar etanol de forma discontinua (Melchior y Tabakoff, 1981; 1985; Kalant, 1989; Poulos y Cappell, 1991; Pohorick y Roberts, 1991; 1992). Desde que la inducción de la dependencia al etanol necesita continuas intoxicaciones o administraciones repetidas en altas dosis, las condiciones que favorecen el desarrollo de la dependencia son diferentes de las que favorecen el desarrollo de la tolerancia. Además, los mecanismos neurobiológicos que llevan a la tolerancia o a los efectos aversivos del etanol no pueden contribuir a la dependencia (Fadda y Rossetti, 1998).

A nivel celular, el tratamiento crónico con etanol aumenta la función mediada por los receptores NMDA (Iorio *et al.*, 1992). La sobrerregulación del receptor NMDA se considera la mayor respuesta neuroadaptativa al bloqueo crónico del etanol (Grant *et al.*, 1990a; Gulya *et al.*, 1991). Además estos procesos neuroadaptativos no se asocian al desarrollo de la tolerancia a los efectos inhibitorios del etanol en la función de los receptores NMDA. A nivel funcional, el etanol disminuye el Glu extracelular en el cerebro de animales despiertos (Carboni *et al.*, 1993; Moghaddam y Bolinao, 1994). La retirada del tratamiento crónico de etanol produce un aumento en la concentración de Glu cerebral (Rossetti y Carboni, 1995; Gonzales *et al.*, 1996), respuesta presumiblemente mediada por la activación de receptores NMDA adaptados (sobrerregulados), aunque el tratamiento crónico con etanol no reduce la capacidad que tiene un estímulo agudo de etanol de reducir los niveles de Glu extracelular en roedores a los que se les retira el alcohol (Rossetti y Carboni, 1995). Además, las respuestas neuroadaptativas que se oponen asociadas al desarrollo de la tolerancia pueden no ser relevantes en los mecanismos de dependencia al etanol. Al contrario, el desarrollo de la dependencia del etanol puede no estar asociado al desarrollo de la tolerancia a los efectos del etanol en aquellos

sustratos que experimentan cambios neuroadaptativos. De hecho existen ejemplos de tratamientos farmacológicos que pueden afectar al desarrollo de la dependencia al etanol pero no a la tolerancia (Snell *et al.*, 1996b).

La tolerancia farmacodinámica viene de la disminución de la sensibilidad de los receptores GABA que aumentan la capacidad de disminuir la conducción de  $Ca^{2+}$ , de la alteración en el sistema amino y disminuye la concentración endógena de opioides (Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994).

### **2.7.2. Tolerancia y Condicionamiento Clásico.**

De acuerdo a los análisis de condicionamiento de Paulov (Siegel 1976, 1987, 1989b; Hinson y Siegel, 1980, Paulos y Cappell, 1991), la tolerancia puede estar mediada no solo por respuestas adaptativas, causadas por la presencia de la droga, sino también por respuestas adaptativas a señales del ambiente que ha marcado la droga en el pasado. Estas respuestas condicionales atenúan la respuesta a la droga (Fadda y Rossetti, 1998).

Bajas dosis de etanol favorecerían el desarrollo de respuestas adaptativas a las señales en el ambiente mediante el aprendizaje asociativo. Al contrario, dosis altas de etanol (tóxicas) que dañan el procesamiento de la información sensorial, limitarían la capacidad de los animales para hacer asociaciones con los estímulos ambientales. Altas dosis, además favorecerían el desarrollo de respuestas adaptativas a los efectos de la droga. El etanol tiene fuertes propiedades estimulantes y esto es una señal efectiva en el control del condicionamiento de la tolerancia a sus propios efectos (Greeley *et al.*, 1984).

Los pocos estudios que han llegado a correlacionar las respuestas de comportamiento a los cambios neuroadaptativos asociados al desarrollo y expresión de la tolerancia indican que las respuestas neuroquímicas pueden ser gobernadas por mecanismos de condicionamiento clásico (Eikelboom y Stewart, 1982; Stewart y Eikelboom, 1987).

La tolerancia a la estimulación de la síntesis de DA en diferentes áreas cerebrales se desarrolla tras la administración repetida de etanol (Fadda *et al.*, 1980; Hoffman y Tabakoff, 1985; Liljequist *et al.*, 1990). Los cambios neuroquímicos se median por respuestas aprendidas a los estímulos que anticipan a los efectos del etanol (Liljequist *et al.*, 1990). De la misma forma, el etanol agudo induce aumentos en plasma de corticosterona (Redei *et al.*, 1988), un efecto mediado por la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) (Rivier *et al.*, 1984); Estos efectos del etanol en la liberación o acción del CRF pueden tener una contribución significativa

a los efectos ansiolíticos del etanol. La tolerancia desarrolla un aumento inducido por etanol en los niveles de corticosterona (Eskay *et al.*, 1993; Wand, 1993). Con esto y otros estudios se demostró que alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis adrenal son mediadas en parte por la respuesta aprendida a la señal que predice los efectos del etanol (Seeley *et al.*, 1996).

Los factores de aprendizaje son uno de los mayores mecanismos mediando la tolerancia a los efectos del etanol de acuerdo con la noción de que la tolerancia desarrolla a los efectos del etanol, no por el etanol *per se* (Kalant *et al.*, 1971; Khanna *et al.*, 1979; Britán y Kalant, 1991; Wenger *et al.*, 1981; Stewart y Badiani, 1993).

### **2.7.3. Tolerancia, Aprendizaje y Receptor NMDA.**

La tolerancia comparte muchas características con el aprendizaje y la memoria (Kalant *et al.*, 1971; Kalant, 1996) por lo que la elucidación del mecanismos de tolerancia puede llevar a un mejor entendimiento del aprendizaje y memoria, y posiblemente a mejorar el tratamiento de los problemas. El aprendizaje puede jugar un papel mayor en el desarrollo de la tolerancia al alcohol y tolerancia cruzada a otras drogas. Muchos de los mecanismos neuronales relacionados al aprendizaje y memoria se conoce que están implicados en el desarrollo y retención de la tolerancia (Kalant, 1998).

Los receptores NMDA están implicados específicamente en los procesos neuroadaptativos asociados al desarrollo de la tolerancia al etanol de varias formas que implican cambios en el aprendizaje y la memoria (Cotman y Monaghan, 1988; Harris y Cotman, 1985; Collingridge y Singer, 1990; Pellicano *et al.*, 1993). Antagonistas selectivos de los receptores NMDA dañan el aprendizaje y la memoria (Morris *et al.*, 1986; Benvenga y Spaulding, 1988; Mondedori *et al.*, 1989; Parada-Turska y Turskay, 1990; Shapiro y Caramonos, 1990; Kant *et al.*, 1991; Danysz y Archer, 1994; Danysz *et al.*, 1995) bloqueando el desarrollo de varios fenómenos relacionados al aprendizaje como son el condicionamiento, la sensibilización (Kim *et al.*, 1991; Stewart y Druhan, 1993) y la potenciación a largo plazo (Swartzwelder *et al.*, 1989). La tolerancia al etanol se bloquea cuando un antagonista competitivo o no competitivo del receptor NMDA se administra seguido del etanol (Wu *et al.*, 1993; Karcz-Kubicha y Liljequist, 1995), a la vez que se dan los procesos de aprendizaje asociativos entre el estímulo de la droga y las señales ambientales como ya ha ocurrido.

Pero el inconveniente mas serio de la hipótesis de que el bloqueo de los receptores NMDA previene el desarrollo de la tolerancia al etanol a través del aprendizaje asociativo, es la pregunta de por qué el etanol no previene la tolerancia,

siendo un antagonista no competitivo de los receptores NMDA que inhibe la potenciación a largo plazo, con una potencia que correlaciona bien con esto para inhibir los receptores NMDA (Sinclair y Lo, 1986; Blitzler *et al.*, 1990; Morrisett y Swrtzwelder, 1993; Tremwell y Hunter, 1994). La tolerancia no dependiente del ambiente puede no ser gobernada por el aprendizaje (Poulos y Cappell, 1991). La inhibición de la tolerancia no asociativa, por antagonistas del receptor NMDA, desafía la hipótesis de que el bloqueo del receptor NMDA daña la tolerancia al etanol mediante la inhibición del aprendizaje asociativo (Khanna *et al.*, 1991a, b; 1992; Wu *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1994). Antagonistas del receptor NMDA pueden ser estímulos condicionantes para la tolerancia al etanol (Carlezon *et al.*, 1995; Wise *et al.*, 1995). Estos interfieren en el desarrollo de esta tolerancia pudiendo interactuar entre los estímulos de la droga y ambientales con la contribución de otros mecanismos como el daño del procesamiento de la información sensorial (Karcz-Kubicha y Liljequist, 1995), mas que a través de procesos de neuroadaptación implicando el aprendizaje asociativo mediado por el receptor NMDA.

Existen muchos datos que indican que exposiciones a concentraciones tóxicas de etanol producen cambios neuroadaptativos asociados a la dependencia (Fadda y Rossetti, 1998).

#### **2.7.4. Tolerancia y Refuerzo.**

Un mecanismo posible por el que la ingesta crónica de etanol puede desembocar en un consumo excesivo es el desarrollo de la tolerancia a los efectos de refuerzo de la droga, aunque no existen evidencias del desarrollo de la tolerancia a los efectos de refuerzo del etanol. La tolerancia a los efectos de recompensa del etanol no se desarrollan porque el desarrollo de los efectos negativos enmascaran las propiedades de recompensa. La tolerancia lleva a los efectos sedativos-hipnóticos, pero esto no desarrolla la liberación de DA inducida por etanol en el estriado ventral (Rossetti *et al.*, 1993), área que se considera implicada en las acciones de refuerzo de varias drogas adictivas, incluyendo el etanol. De la misma forma, bajo un tratamiento similar, la no tolerancia desarrolla la estimulación inducida por etanol de las células que descargan DA en el VTA (Diana *et al.*, 1992b). Diferentes estudios han demostrado que el etanol no hace que desaparezca la capacidad de aumentar la liberación de DA o estimular la actividad neuronal de DA tras la retirada del tratamiento con etanol (Diana *et al.*, 1992a; 1993; Rossetti *et al.*, 1992a), este restaura las deficiencias en DA que se producen tras la retirada de la exposición de prolongadas dosis de etanol (Weiss *et al.*, 1996). La falta de tolerancia del sistema DA a los efectos del etanol tras el tratamiento crónico o durante la retirada es otro ejemplo incompatible con la teoría de los procesos opuestos de la dependencia

aunque muchos cambios adaptativos ocurran en el sistema DA seguido del etanol crónico (Fadda y Rossetti, 1998).

El refuerzo positivo, producido por dosis de alcohol moderadas, puede ser el resultado de los efectos estimuladores o euforizantes del etanol y por la reducción de la ansiedad en ciertas condiciones (Samson, 1987; Cunningham *et al.*, 1992).

Diferentes sistemas de neurotransmisores han sido implicados en los efectos de refuerzo del alcohol en roedores y también en humanos. Estos son el sistema dopaminérgico, GABAérgico, serotoninérgico y peptidérgico, y como ya se sabe, en el cerebro la actividad de estos sistemas se ve afectada por concentraciones de etanol bajas-moderadas. Los mecanismos dopaminérgicos y GABAérgicos claramente parecen estar implicados en este efecto, y la modulación de los sistemas peptidérgico y serotoninérgico puede a su vez modular dicho efecto de refuerzo positivo del etanol (Koob y Bloom, 1988). El circuito implicado en la acción de refuerzo positivo tiene como punto importante el sistema de recompensa que implica al cerebro medio, donde comienza el sistema dopaminérgico, y las áreas del cerebro basal del AC, donde termina el sistema DA mesolímbico (Koob, 1992). Los receptores GABA<sub>A</sub> y 5HT<sub>1A</sub> parecen estar implicados en la modulación de los niveles de ansiedad, se puede considerar que la activación o bloqueo de estos sistemas de receptores respectivamente pueden mediar las acciones de refuerzo negativo del etanol. Se puede considerar que diferentes antagonistas-agonistas pueden afectar diferencialmente a las acciones de refuerzo positivas o negativas del etanol.

Antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> disminuyen la ingesta voluntaria de etanol (Hyytia y Koob, 1995). Este sistema de receptores en el AC puede estar implicado en la mediación de la finalización de la ingesta de etanol (Hodge *et al.*, 1995) más que en la iniciación o mantenimiento de la respuesta de refuerzo del etanol. Existen evidencias significativas que indican que los mecanismos dopaminérgicos, específicamente en el sistema mesolímbico, tienen un papel en el refuerzo del alcohol. El etanol puede estimular la liberación de DA en el AC. Los antagonistas de la DA y agonistas parciales disminuyen la respuesta del etanol (Pfeiffer y Samson, 1988; Bono *et al.*, 1996). El sistema peptidérgico puede modular la liberación de DA y los antagonistas de los opiáceos disminuyen la ingesta de alcohol (Reid y Hunter, 1984; Volpicelli *et al.*, 1986). Los antagonistas del receptor de 5HT<sub>3</sub> pueden reducir la estimulación inducida por etanol de la liberación de DA en el AC (Carboni *et al.*, 1989; Wozkiak *et al.*, 1990; Campbell y McBride, 1995), y estos antagonistas bloquean el consumo de etanol (Fadda *et al.*, 1991b; Knapp y Pohorecky, 1992; Hodge *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1993; Sellers *et al.*, 1995).

## **2.8. NEUROADAPTACIÓN Y DEPENDENCIA AL ETANOL.**

La dependencia es la pérdida del control sobre el consumo y la incapacidad aparente para modificar el hábito de la bebida a pesar de las consecuencias negativas. Se caracteriza por un modelo perjudicial de conducta crónica, compulsiva de la ingesta de bebida (Erickson, 1996).

El desarrollo de la dependencia al etanol y la abstinencia asociada al síndrome de retirada en humanos necesita el consumo continuo de grandes cantidades de alcohol por un largo tiempo. Cuando se retira bruscamente la ingesta de etanol se produce el síndrome de retirada, los síntomas de excitación del SNC y los signos de la activación neurovegetativa (Victor y Adams, 1953; Lerner y Fallon, 1985).

Dosis tóxicas de etanol se asocian a cambios neuroadaptativos en muchos sistemas neurotransmisores y mecanismos de transducción (Tabakoff *et al.*, 1996; Tabakoff y Hoffman, 1996a; Diamon y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). Se tendrán en cuenta las alteraciones funcionales asociadas a los sistemas GABA y Glu que son los mayores neurotransmisores inhibidores y excitadores respectivamente, y las neuronas que usan estos neurotransmisores son más del 80% de las existentes en el cerebro. Los cambios neuroadaptativos que suceden en estos sistemas tienen importancia en los efectos neuroquímicos y de conducta asociadas a la dependencia del etanol. El primer síntoma es el daño del control por uso de drogas (Rinaldi *et al.*, 1988, Morse y Flavin, 1992). Este daño del control puede tener causas genéticas o neuroquímicas (Erickson *et al.*, 1990; Erickson, 1996).

### **2.8.1. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión GABA.**

Se ha descrito que el GABA es el mayor neurotransmisor inhibidor del cerebro que media al menos en el cincuenta por ciento de las sinapsis de la corteza cerebral (McGeer y McGeer, 1989) y esto queda evidenciado por la distribución homogénea del GABA entre las diferentes regiones de la corteza (Peinado *et al.*, 1986). Esta participación en las sinapsis corticales contrasta con los bajos niveles de este aminoácido en el espacio extracelular. Esto parece ser debido, al menos en parte, a los eficientes mecanismos de recaptación de la glia y neuronas (Worrall y Willians, 1994). El origen del GABA extracelular es muy controvertido y posiblemente varía según los casos. Algunos autores proponen mecanismos de liberación calcio-independientes, incluyendo fuentes metabólicas gliales o mecanismos de transporte reversos (Bernarth, 1992; Worrall y Willians, 1994) y otros sugieren mecanismos de liberación calcio-dependientes (Campbell *et al.*, 1993). La entrada de calcio resulta de la actividad neuronal ocurrida a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. En el cerebro diferentes tipos de estos canales están implicados llevando a

cabo la liberación de neurotransmisores en el terminal nervioso (Takanashi y Momiyama 1993; Turner *et al.*, 1993).

No está bien descrito que la respuesta de los receptores GABA<sub>A</sub> se potencia por concentraciones farmacológicamente relevantes de etanol (Tabakoff y Hoffman, 1996b; Tabakoff *et al.*, 1996; Diamond y Gordon, 1997). Algunos estudios sugieren que la sensibilidad de los receptores GABA<sub>A</sub> al etanol necesita de la fosforilación del receptor (Weiner *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1995) o la presencia de una subunidad concreta (Wafford *et al.*, 1991), aunque esto no está del todo confirmado. Como ya se ha visto, la similitud de las acciones del etanol, benzodiazepinas y barbitúricos son la base de las teorías iniciales de la acción del etanol en el cerebro llevando a pensar que las tres clases de drogas comparten algún mecanismo de acción unido al canal iónico acoplado al receptor GABA. Las alteraciones de los canales de Cl<sup>-</sup> del receptor GABA<sub>A</sub> parecen contribuir a algunos de los signos y síntomas del síndrome de retirada del etanol (Morrow *et al.*, 1992); Estos efectos pueden estar asociados con una disminución de la sensibilidad del canal Cl<sup>-</sup> acoplado al receptor GABA<sub>A</sub>, en la corteza cerebral y cerebelar. La administración crónica del etanol altera la expresión del ARNm de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en la corteza cerebral, hipocampo y VTA (Morrow *et al.*, 1990; Montpied *et al.*, 1991; Mhatre y Ticku, 1994; Devaud *et al.*, 1995; Charlton *et al.*, 1997) y en la retirada se ven cambios en el ARNm del receptor GABA<sub>A</sub> y proteínas (Devaud *et al.*, 1997). El etanol crónico tiene efectos en varias subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, sugiriendo así la complicación de los mecanismos reguladores de la interacción del etanol con el GABA<sub>A</sub>. Mientras la función del GABA parece estar afectada por el etanol crónico (Kang *et al.*, 1996) otros estudios no lo demuestran, por lo que no está claro si las alteraciones neuroadaptativas del receptor producen alteraciones de la neurotransmisión GABAérgica. Las neuronas GABAérgicas también tienen receptores Glu, al contrario que la transmisión glutamatérgica que está especialmente mediada por receptores NMDA; Puede estar modulada por la transmisión GABAérgica (Dingledine *et al.*, 1986) aparentemente vía receptores GABA<sub>B</sub> presinápticos regulando la liberación de Glu (Kombian *et al.*, 1996). Las alteraciones de la función GABAérgica seguidas de etanol crónico puede ser una respuesta secundaria compensatoria a la sobreactivación de la neurotransmisión glutamatérgica (Fadda y Rossetti, 1998).

La potenciación del etanol sobre la acción del GABA en receptores GABA<sub>A</sub> se espera que contribuya a la acción ansiolítica del etanol debido al papel que juega en la modulación de la ansiedad. La ingesta de cantidades bajas-moderadas pueden disminuir la ansiedad a la respuesta a factores estresantes. Dosis relativamente bajas se asocian al efecto positivo que incluye la relajación (Pohorecky, 1981). Los ratones necesitan altas dosis para que se produzcan efectos ansiolíticos, ya que son mas resistentes. Los antagonistas de receptores de benzodiazepinas y agonistas inversos

invierten el efecto del etanol; Los efectos no estimulantes pueden estar mediados por la acción del etanol en el complejo del receptor de benzodiazepinas-GABA (Eckardt *et al.*, 1998).

### **2.8.2. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión de Glutamato.**

El tratamiento crónico con concentraciones tóxicas de etanol lleva a la sobre-regulación del receptor NMDA, aumenta el ARNm de las subunidades funcionales del receptor y por tanto aumenta la función del receptor (Hu y Ticku, 1995; Follesa y Ticku, 1996b; Hu *et al.*, 1996; Snell *et al.*, 1996a; Tabakoff *et al.*, 1996; Tabakoff y Hoffman, 1996a; Chen *et al.*, 1997; Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). Estas alteraciones se consideran una respuesta neuroadaptativa causada por el bloqueo crónico de los receptores NMDA por etanol, esto sugiere una base para alguno de los efectos cognitivos del etanol ya que el receptor NMDA parece jugar un papel importante en ciertas formas de aprendizaje (Collingridge y Lester, 1989; McBain y Mayer, 1994). El aumento mediado por receptores NMDA de la neurotransmisión excitadora puede ser considerado el mayor proceso neuroadaptativo que causa el síndrome excitatorio al retirar el consumo crónico de etanol. También la retirada de la administración crónica de etanol de los antagonistas competitivos del receptor NMDA induce un síndrome de hiperexcitabilidad (Ripley y Little, 1995). La administración de antagonistas del receptor NMDA disminuye la sintomatología de la retirada (Grant *et al.*, 1990a; Liljequist, 1991; Morrisett *et al.*, 1990; Rossetti y Carboni, 1995) mientras que los agonistas del receptor NMDA la empeoran (Danysz *et al.*, 1992; Davidson *et al.*, 1995; Morrisett *et al.*, 1990; Sanna *et al.*, 1993). Experimentos recientes indican que el etanol a dosis farmacológicamente importantes puede afectar la neurotransmisión glutamatérgica presináptica por la alteración de los niveles del Glu extracelular a pesar de que muchos estudios la han considerado postsináptica en los receptores NMDA (Carboni *et al.*, 1993; Moghaddan y Bolinao, 1994). Además, el etanol como antagonista del receptor NMDA puede prevenir los incrementos calcio-dependientes de los niveles de Glu inducidos por activación de los receptores NMDA *in vivo* (Rossetti *et al.*, 1990; Young y Bradford, 1991; Bustos *et al.*, 1992; Carboni *et al.*, 1993; Morari *et al.*, 1996). Estos niveles incrementados de Glu son relevantes funcional y conductualmente ya que pueden representar una correlación neurobiológica con la retirada del etanol (Rossetti y Carboni, 1995). Estos resultados se complementan con la hipótesis de que el Glu puede ser liberado por activación de los receptores NMDA a través de un mecanismo positivo de feedback. Muchos mecanismos de autoalimentación unidos a la activación de los receptores NMDA pueden contribuir a aumentar la liberación de Glu:

- El flujo de calcio, gracias a la sobre-regulación de los receptores NMDA, puede activar a la fosfolipasa 2 (PLA<sub>2</sub>) generando aminoácidos y radicales libres (Dumuis *et al.*, 1988). Esto puede aumentar el Glu extracelular al

activar los receptores NMDA (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1988; Williams, 1989) o por inhibición de la captura glial de Glu (Volterra *et al.*, 1994) o por las dos causas.

- El aumento intracelular de calcio mediado por el receptor NMDA puede activar a la óxido nítrico sintasa (NOS) regulada por la PKC dependiente del sistema calcio-calmodulina, con la liberación de NO (Schuman y Madison, 1994). La liberación retrógrada de NO puede activar los receptores NMDA y liberar Glu (Nei *et al.*, 1996; Bogdanov y Wurtman, 1997).
- El aumento de Glu, mediado por receptores NMDA, aumenta en la liberación de Glu pudiendo ser también por activación de los receptores NMDA en los terminales o axones glutamatérgicos (autoreceptores).

Pero la existencia de autorreceptores que regulan la liberación de Glu es todavía hipotética. Existen evidencias de una localización presináptica de los receptores NMDA en neuronas excitadoras en el hipocampo (Siegel *et al.*, 1994) y espina dorsal (Liu *et al.*, 1994) y evidencias indirectas tanto neuroquímicas (Collins *et al.*, 1983; Rossetti *et al.*, 1990; Young y Bradford, 1991; Bustos *et al.*, 1992; Carboni *et al.*, 1993; Rossetti y Carboni, 1995; Morari *et al.*, 1996) como electrofisiológicas (García-Muñoz *et al.*, 1991; Berretta y Jones, 1996) que indican una facilitación de la liberación de la actividad de los receptores NMDA presinápticos.

Antagonistas no competitivos del receptor de Glu y antagonistas competitivos del receptor NMDA tienen acciones ansiolíticas.

Debido a la localización general de los receptores de Glu en todas las estructuras cerebrales y la disfunción y densidad de la inervación glutamatérgica a través del cerebro (Mayer y Westbrook, 1987), las variaciones en la liberación de Glu pueden ser un proceso neuroadaptativo primario que podría afectar la función de las estructuras cerebrales y sistemas de neurotransmisión. Además los cambios neuroadaptativos en el sistema glutamatérgico pueden tener relevancia en las alteraciones neuropatológicas inducidas por el etanol crónico en el cerebro de animales y humanos. Es por esto que el alcoholismo se ha considerado un desorden neuropsiquiátrico relacionado al Glu (Tsai *et al.*, 1995).

### **2.8.3. Dependencia del Etanol y Neurotransmisión de Dopamina.**

Existen evidencias electrofisiológicas, neuroquímicas y de conducta que muestran como a dosis farmacológicamente importantes el etanol activa el sistema mesolímbico dopaminérgico (Fadda *et al.*, 1980; 1989; 1991a; Mereu *et al.*, 1984;

Gessa *et al.*, 1985; Imperato y Di Chiara, 1986; Brodie *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1993). El sistema mesolímbico dopaminérgico sale de VTA del mesencéfalo, proyectando a las estructuras límbicas, incluyendo el septo del AC. La retirada del tratamiento crónico con etanol se asocia a una profunda disminución en la liberación de DA *in vitro* (Darden y Hunt, 1977) o *in vivo* (Rossetti *et al.*, 1991a; 1992a,b,c; Weiss *et al.*, 1996). Un efecto unido a la reducción de la actividad neuronal de las neuronas dopaminérgicas de VTA en estas condiciones (Diana *et al.*, 1992a; 1993). Las alteraciones en la actividad y expresión de las enzimas que sintetizan DA son transitorias y paralelas al desarrollo de la sintomatología de la retirada (Neff *et al.*, 1995) y esto indica que la retirada del etanol se asocia a una denervación dopaminérgica temporal (Lal *et al.*, 1988).

#### **2.8.4. Dependencia del Etanol e Interacciones Glutamato-Dopamina-GABA.**

La exposición al etanol a largo plazo aumenta la inmunoreactividad de subunidades NMDA R1 en el VTA, mientras que reduce la inmunoreactividad de la subunidad  $\alpha_1$  del complejo del receptor GABA (Trevisan *et al.*, 1994; Ortiz *et al.*, 1995; Charlton *et al.*, 1997). La inhibición reducida acoplada a la excitación aumentada de las células dopaminérgicas del VTA durante la retirada parece resultar de la sobre-excitación y bloqueo del paso del impulso mesolímbico (Shen y Chiado, 1993; Ortiz *et al.*, 1995; Fitzgerald *et al.*, 1996). La reducción de las neuronas dopaminérgicas activas en la retirada del etanol ha sido puesta en duda (Diana *et al.*, 1995) y los mecanismos de bloqueo de la despolarización son incompatibles con el resultado de que el etanol, el cual, cuando se da en estímulos agudos estimula las células cargadas de DA del VTA restaurando los niveles normales de DA en su retirada (Rossetti *et al.*, 1991b; 1992a,b; Diana *et al.*, 1993).

La conducción excitatoria mediada por un receptor NMDA media la reducción de la actividad dopaminérgica. En el estado de retirada el Glu ejerce un control inhibitorio en la liberación de DA y de la liberación de DA parece no ser causada por inactivación de la despolarización. No se conocen bien los mecanismos de las células disparadoras de DA y del aumento en la liberación por cantidades agudas de etanol. Se ha propuesto que un mecanismo de desinhibición está implicado en la acción directa del etanol en los receptores GABA<sub>A</sub>: la actividad del sistema DA puede ser secundario a la inhibición de las interneuronas GABAérgicas que inervan las células VTA-DA (Mereu y Gessa, 1985).

Los efectos agudos de etanol en la liberación de DA no están mediados por la acción directa de los receptores GABA<sub>A</sub>. Un mecanismo alternativo para la estimulación inducida por etanol de la liberación de DA puede implicar la desinhibición de las células VTA-DA por el bloqueo de los receptores del Glu en

---

aferencias inhibitoras locales o distales o las células DA, de acuerdo al mecanismo propuesto para los efectos de antagonistas no competitivos del receptor NMDA (French y Ceci, 1990; Imperato *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1992). Como el etanol, la administración sistémica de antagonista de los receptores NMDA, aumentan la descarga de las neuronas dopaminérgicas (French y Ceci, 1990; Zhang *et al.*, 1992; Murase *et al.*, 1993) y puede estimular la liberación, la síntesis y el metabolismo de DA en las áreas dopaminérgicas terminales (Liljequist *et al.*, 1991; Löscher *et al.*, 1991; Bristow *et al.*, 1993; Hondo *et al.*, 1993; Hadjiconstantinon *et al.*, 1995; Druhan *et al.*, 1996; Mathe *et al.*, 1996; Schmidt y Fadayel, 1996).

### **2.8.5. Dependencia, Depresión y Disminución de Dopamina.**

El sistema DA mesocorticolímbico se considera que está implicado en los efectos motivacionales de refuerzos naturales como en el abuso de las drogas (Wise y Rompré, 1989; Wise, 1996) y se ha visto que este sistema también está implicado en los efectos de recompensa del etanol (Fadda y Gessa, 1985; Imperato y Di Chiara, 1986; Cloninger, 1987; Fadda *et al.*, 1988; 1989; 1991a; Koob, 1992; Samson y Harris, 1992; McBride *et al.*, 1997).

La inhibición rebote del sistema dopaminérgico que sucede tras la retirada es una correlación neurobiológica de los síntomas depresivos y la disforia de la abstinencia (Diana *et al.*, 1992a; Rossetti *et al.*, 1992a,b,c; Weiss *et al.*, 1996), es una depresión rebote del mecanismo de refuerzo positivo (Schulteis *et al.*, 1995). La depleción de DA y la depresión del sistema de recompensa parece constituir un denominador común de la abstinencia de intoxicaciones crónicas de varias drogas, entre ellas el etanol. Los cambios neuroadaptativos en la función dopaminérgica, seguido de la retirada del etanol, han sido propuestos como el sustrato neurobiológico del deseo para el etanol en sujetos dependientes (Rossetti *et al.*, 1992a,b,c; Diana *et al.*, 1993; Schulteis *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1996).

Se han realizado suficientes estudios sobre la adicción del sistema mesolímbico, porción del cerebro que implica la capacidad de sentir placer. A nivel celular los efectos de la droga serán explicados por sus acciones en la áreas pre y postsinápticas de las células en el sistema mesolímbico (Wise y Rompré, 1989):

- Centros del control hipotalámico, son uno de los principales sitios de acción del alcohol. El hipotálamo, que controla el hambre, la sed, el placer, la actividad sexual, etc. gobierna la supervivencia diaria (Lewis, 1996). Como tiene muchas comunicaciones, si un centro se daña afecta a los demás.

- Cerebro medial, responsable del refuerzo positivo asociado a la adicción de drogas (Gold y Miller, 1992). Se conoce como la vía del placer. Tiene cuatro partes funcionales, el hipotálamo lateral, el área tegmental medial, el AC y la corteza frontal (Wise, 1987; Koob y Bloom, 1988; Koob, 1992; Samson y Harris, 1992).

## 2.9. ALCOHOL Y DESARROLLO CEREBRAL.

El alcohol es un teratógeno físico y de conducta que afecta al desarrollo del SNC, ya que es especialmente vulnerable en la etapa de gestación. La mayoría de las investigaciones se han centrado en los efectos de la exposición a dosis altas de alcohol, las cuales pueden originar cambios morfológicos y desórdenes en el comportamiento de la progenie de madres que tomaron etanol durante el embarazo (Streissguth y Martin, 1983). El modelo extremo de daños fisiológicos y psicológicos resultantes del consumo de etanol en el embarazo se llama Síndrome Fetal Alcohólico (SFA) (Jones y Smith, 1973; Claren y Smith, 1978). El SFA se caracteriza por el retraso en el crecimiento pre y postnatal, por disfunciones en el SNC (retraso mental) y malformaciones craneoencefálicas (microencefalia, debido a la excesiva pérdida de tejido cerebral por muerte neuronal) (Clarren y Smith, 1978; Rossett 1980; Streissguth *et al.*, 1980b; Levy y Koren, 1990; Bellinger *et al.*, 1999). Mas concretamente, en los últimos días del desarrollo se produce una alteración de los circuitos nerviosos (Diaz y Samson, 1980; West y Hamre, 1985).

La toxicidad del etanol parece ser directa y menos reversible durante el desarrollo cerebral que en el cerebro de bebedores adultos. Este hecho da seriedad a la toxicidad del alcohol durante el desarrollo del SNC, justificando así los estudios con el objetivo potencial de desarrollar estrategias preventivas. El hecho de que el cerebro pase por diferentes estados de desarrollo, los cuales son particularmente vulnerables a agentes teratógenos, incluyendo el alcohol, quiere decir que la dosis umbral de alcohol capaz de producir efectos perjudiciales parece variar según el estado de desarrollo. Además, hay que prestarle atención a factores tales como el tiempo y la clase de bebida alcohólica, que es potencialmente importante en la determinación de la magnitud y naturaleza del daño que se produce (Eckardt *et al.*, 1998). Sigue en estudio la cantidad de etanol necesaria para producir déficit en el SNC de la progenie (Eckardt *et al.*, 1998).

Se ha visto que un solo sorbo en un periodo de gestación importante puede llevar a una impacto importante del desarrollo de recién nacido (Bonthius y West, 1990; Streissguth *et al.*, 1990; Streissguth *et al.*, 1994; Holzman *et al.*, 1995). Las altas dosis llevan a las consecuencias mas severas y se asocian a anomalías morfológicas, retardo metabólico y déficit sensorial (Jacobson *et al.*, 1993; Jacobson

*et al.*, 1996). Existe una relación dosis-dependiente entre las anomalías craneoencefálicas y la ingesta materna. Los datos se asocian principalmente a los estadios tempranos del desarrollo (Streissguth *et al.*, 1984; Jacobson y Jacobson, 1994). Se ha visto que la progenie de mujeres embarazadas que no dejan de beber es mas hiperactiva, con mayores problemas de lenguaje y daños motores que aquellos de madres que dejaron de beber, los efectos son acumulables (Coles *et al.*, 1991).

Durante las últimas décadas se han hecho bastantes estudios que permitieran relacionar el nivel de consumo de alcohol durante el embarazo y los efectos de comportamiento en la progenie. Algunos datos de estos estudios indican que el consumo moderado de alcohol en el desarrollo cerebral tiende a producir mas efectos en el comportamiento que efectos físicos, y que estos efectos son sutiles y variables. Esta situación está en línea con el principio de dosis-efecto: niveles bajos de exposición a toxinas parecen producir un déficit funcional mas que problemas en el crecimiento o malformaciones (Voorhess y Mollnow, 1987).

Desde hace años se han hecho estudios en el rendimiento intelectual, el cual se ve afectado (Streissguth *et al.*, 1980a; O'Connor *et al.*, 1986; Fried y Watkinson, 1988; Streissguth *et al.*, 1990; Greene *et al.*, 1991; Fried *et al.*, 1992a; Jacobson *et al.*, 1993). También se han estudiado las consecuencias de la conducta en la progenie de madres que consumieron etanol de forma moderada viendose problemas de aprendizaje y atención junto con desordenes en el procesamiento del lenguaje de los niños. Y esto se asocia al consumo moderado de alcohol de una madre durante el embarazo (Fried y Watkinson, 1988; Fried y Watkinson, 1990; Greene *et al.*, 1990; Streissguth *et al.*, 1990; Fried *et al.*, 1992a; Fried *et al.*, 1992b; Jacobson *et al.*, 1992; Streissguth *et al.*, 1993; Fried *et al.*, 1994; Streissguth *et al.*, 1994; Streissguth *et al.*, 1995; Kopera-Frye *et al.*, 1996).

En estudios de conducta neuronal en humanos, el umbral para ver los efectos se define usualmente en términos de el nivel de exposición a una toxina bajo la cual el rendimiento medio del grupo no se afecta negativamente. Pero esto varia ya que unos individuos son mas sensibles que otros (Streissguth *et al.*, 1993; Jaconson y Jacobson, 1994; Jaconson *et al.*, 1994; Streissguth *et al.*, 1994). Los problemas de conducta en niños expuestos prenatalmente al alcohol se piensa que son indicativos del desarrollo normal del SNC. Estudios en animales han demostrado que el cerebro puede ser el órgano mas sensible a los efectos adversos del alcohol durante el desarrollo. Incluso, usando modelos animales, en los que es posible eliminar otros factores que puedan confundir o influenciar el desarrollo cerebral (nutrición, uso de otras drogas por parte de la madre, etc.). Los efectos se parecen a aquellos observados en humanos ocurridos tras la exposición prenatal al alcohol (Driscoll *et al.*, 1990). Además, debería tenerse cuidado al extrapolar los resultados de animales a humanos,

porque hay diferencias en las especies en el metabolismo del alcohol, el tiempo del desarrollo cerebral y la complejidad del SNC. Dentro de los animales, el etanol interfiere con todos los estados del desarrollo cerebral, siendo los efectos neurotóxicos dependientes de la dosis (mayor dosis: mayor daño) (Bonthius y West, 1990) y del tiempo (algunos periodos son mas sensibles que otros, en los mas tempranos se producen mayores daños) (Sulik *et al.*, 1981; Bonthius y West, 1990). Pero el daño no es uniforme en todas las regiones, incluso en una misma región algunas poblaciones celulares pueden ser mas vulnerables a los efectos del alcohol que otras. Las regiones en las que mas se notan los efectos tóxicos del alcohol son neocortex, hipocampo y cerebelo (Barnes y Walker, 1981; Bonthius y West, 1990; Goodlett *et al.*, 1991; Miller, 1992; Guerri, 1998).

Los efectos neurotóxicos producidos (Sulik *et al.*, 1981; Bonthius y West, 1990) en el SNC fetal, cuando el cerebro está en formación, son mas directos y menos reversibles que en adultos, incluso a dosis moderadas. Algunos de estos efectos son: desordenes mentales, sensoriales y morfológicos, problemas de aprendizaje, junto con lenguaje y atención deficiente. También se desarrollan alteraciones hormonales que tendrán su efecto en la maduración sexual, que estará retardada y con la función reproductiva alterada (Eckardt *et al.*, 1998).

Aunque muchos mecanismos han sido propuestos para explicar el efecto tóxico del alcohol en el desarrollo cerebral (West *et al.*, 1994), los mecanismos moleculares y celulares que inducen a esta patofisiología cerebral fetal tienen que ser mejor clarificados. Es necesario informar acerca de como el alcohol afecta a la funcionalidad del cerebro además de la estructura, porque las anomalías estructurales no necesariamente se traducen en daños observables. El conocimiento sobre la función cerebral puede ayudar a definir las relaciones entre anomalías en el SNC y daños conductuales y cognitivos (Eckardt *et al.*, 1998).



### 3. PROCESOS NEURODEGENERATIVOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

#### 3.1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años la comunidad científica está realizando un gran esfuerzo para conocer las causas de los procesos neurodegenerativos que tienen lugar en el SNC, en distintos tipos de situaciones (Katzman, 1988; Reinikainen *et al.*, 1990; Von Drass y Blumental, 1992; Fulop y Seres, 1994). En términos generales se ha propuesto que los procesos neurodegenerativos parecen ser causados por tres mecanismos. Por un lado, se ha comprobado que existen deficiencias energéticas, no sólo limitadas a desórdenes en los que el suministro de sustratos está reducido (isquemia, hipoglucemia) sino que también aparece en pacientes con trastornos crónicos de diferente etiología, como las enfermedades de Huntington, Parkinson, Alzheimer (Lees, 1993; Almeida *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 1994; Roberts y Chih, 1995; Sims, 1996; Borlongan *et al.*, 1997; Bolaños *et al.*, 1997; Mamelak, 1997; Mark *et al.*, 1997) o esclerosis lateral amiotrófica (Kok, 1997; Shaw e Ince, 1997). En segundo lugar, la hiperactividad de los neurotransmisores ácidos (Glu y Asp) conduce a que estas sustancias actúen como potentes toxinas endógenas originando degeneración y muerte neuronal (Olney, 1978; Coyle, 1983; Frandsen y Schousboe, 1990; Palmer y Gershon, 1990; Shaw, 1992; Lees, 1993; McEntee y Crook, 1993; Hannan, 1996; Martínez-Martos *et al.*, 1996; Shaw e Ince, 1997; Pringle *et al.*, 1997). Por último, la participación de los radicales libres originados en el metabolismo ha erigido también recientemente el estrés oxidativo como causa de gran importancia en los procesos neurodegenerativos (Tritschler *et al.*, 1994; Benzi y Moretti, 1995; Cini y Moretti, 1995; Reiter, 1995; Williams, 1995; Davis *et al.*, 1997; Fernández-Novoa *et al.*, 1997; Mark *et al.*, 1997; Multhaup, 1997). Sin embargo, estos mecanismos no son excluyentes sino que parecen compartir un origen común, último responsable del desarrollo de los procesos de degeneración y muerte neuronal, y éste parece ser el incremento excesivo de la concentración de calcio libre citosólico (Choi, 1988a,b; 1992; Choi y Hartley, 1993; Lees, 1993; Khachaturian, 1994; Martini *et al.*, 1994; Smith-Swintosky *et al.*, 1994; Martínez-Martos *et al.*, 1996; McMahon *et al.*,

1996; Abdelhamid y Tymianski, 1997; García *et al.*, 1997; Scorziello *et al.*, 1997; Sieber *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997).

### 3.2. PROCESOS NEURODEGENERATIVOS INDUCIDOS POR DEFICIENCIAS ENERGÉTICAS.

El SNC es especialmente vulnerable a variaciones energéticas debido al alto metabolismo que desarrollan las neuronas y a su baja capacidad de almacenamiento de sustratos ricos en energía. Por tanto, fallos en la capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía o la simple necesidad de responder rápidamente a un mayor requerimiento de la misma pueden disminuir la viabilidad neuronal (Lees, 1993).

La muerte celular puede darse como consecuencia de la falta de glucosa o de oxígeno; aunque las neuronas pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones de hipoglucemia o hipoxia, la combinación de ambas situaciones es más lesiva (Goldberg *et al.*, 1987; Monyer *et al.*, 1990; Kaku *et al.*, 1991; Tombaugh y Sapolski, 1990; Pringle *et al.*, 1997; Sieber *et al.*, 1997). Estos fallos en el suministro de sustratos ricos en energía provocan cambios en la concentración intracelular y extracelular de iones y, con ello del potencial de membrana (Martin *et al.*, 1994). Debido a estos cambios puede producirse hiperpolarización o despolarización de las membranas, pudiendo coincidir ambos procesos en el mismo área del cerebro (Hansen *et al.*, 1982; Krnjevic y Ben-Ari, 1989) o entre poblaciones de neuronas con propiedades funcionales similares (Luhmann y Heinemann, 1992). Si un daño o lesión se mantiene un tiempo prolongado puede darse la despolarización de todas las neuronas dependiendo de factores como la gravedad de insulto (Jiang y Haddad, 1992) y la temperatura (Taylor y Weber, 1993; Sattler *et al.*, 1997). Se han llevado a cabo gran número de estudios que intentan relacionar estos cambios con la concentración iónica; así se han implicado a iones  $K^+$  (Krnjevic y Leblond, 1989; Luhmann y Heinemann, 1992),  $Na^+$  y  $Cl^-$  (Hansen y Zeuthen, 1981; Jiang *et al.*, 1992; Friedman y Haddad, 1993; Haddad y Jiang, 1993) y  $Mg^{2+}$  (Chopp *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1994; Hartnett *et al.*, 1997).

En estos procesos el ión  $Ca^{2+}$  merece especial interés. El aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico se debe a la liberación del ión desde sus almacenes intracelulares (Katchman y Hershkowitz, 1993); además, también puede entrar a través de canales  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes (Peinado *et al.*, 1996) o por canales operados por receptor como los NMDA (McDermott *et al.*, 1986; Krnjevic y Leblond, 1989). Alteraciones en la excitación sináptica en condiciones de anoxia llevarían a la disminución de las corrientes de  $Ca^{2+}$ , y tras un proceso de isquemia la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de

canales operados por receptor tendría importancia debido a la liberación de Glu durante la despolarización de la membrana (Lobner y Lipton, 1993).

La falta de sustratos también produce una disminución en los potenciales postsinápticos excitatorios debido al descenso en la liberación de neurotransmisores y la unión de estos a sus receptores, a la falta de eficacia en el acoplamiento de los receptores postsinápticos, a la conductancia sináptica o a cualquier cambio que disminuya la fuerza electroquímica entre los iones implicados en generar corrientes sinápticas (Martin *et al.*, 1994). Este aspecto estaría relacionado con la inhibición por anoxia de las corrientes de  $Ca^{2+}$  debido al bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  presinápticos (Krnjevic y Leblond, 1987).

De igual modo, la adenosina nucleósido, constituyente del adenosin-trifosfato (ATP), ha sido considerada como inhibidora de la transmisión sináptica excitatoria inducida por anoxia o isquemia. Aunque su mecanismo de actuación todavía no está bien definido (Dunwiddie *et al.*, 1996), probablemente activa canales presinápticos de  $K^+$  y bloquea canales presinápticos de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Fredholm y Dunwiddie, 1988), habiéndose demostrado que en cultivos de astrocitos provoca apoptosis (Abbracchio *et al.*, 1995).

En isquemias cerebrales severas se produce un incremento en la concentración extracelular de aminoácidos excitatorios (Asp y Glu) (Fabricius *et al.*, 1993; Pringle *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1997) debido al aumento en la liberación de estos aminoácidos. Se ha demostrado (Katchman y Hershkowitz, 1993) que bajo condiciones de hipoxia se da un incremento en la liberación de Glu dependiente de  $Ca^{2+}$  desde sus almacenes intracelulares, debido a la despolarización neuronal, influjo de  $Ca^{2+}$  y exocitosis (Drejer *et al.*, 1985; Katayama *et al.*, 1991) siendo concomitante con la elevada salida de  $K^+$  (Katayama *et al.*, 1991). También puede aumentar la concentración extracelular de aminoácidos excitatorios por la inhibición de la recaptación de Glu en neuronas y astrocitos (Bouvier *et al.*, 1992).

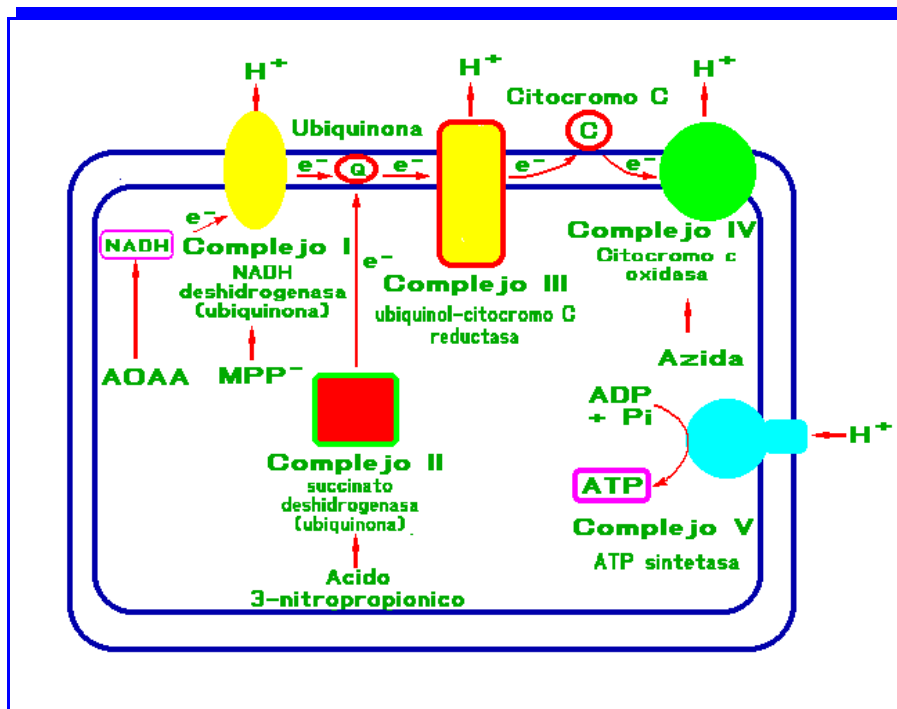
Los procesos neurodegenerativos provocados por fallos energéticos abarcan a todos aquellos trastornos asociados a alteraciones en la fosforilación oxidativa, ya que existen numerosos trabajos que sugieren la existencia de defectos energéticos en enfermedades neurodegenerativas (Beal, 1992) (*tabla 1.3.1.*), aunque sea difícil diferenciar si los cambios observados son causa o consecuencia secundaria de la muerte neuronal y astrogliosis (Beal *et al.*, 1993).

Enfermedad	Sistema Afectado	Localización	Grado de Deterioro
Enfermedad de Parkinson	Complejo I	Cerebro	
		Corteza	0-15%
		Estriado	0-23%
		Sustancia nigra	35%
		Plaquetas	1-55%
		Músculo	5-66%
Enfermedad de Huntington	Complejo IV	Cerebro	
	Complejo I	Corteza	>0%
		Estriado	31%
		Plaquetas	72%
Enfermedad de Alzheimer	Complejo IV	Cerebro	
		Corteza	16-26%
		Estriado	2%
		Hipocampo	<0%
		Plaquetas	50%
Cuadro demente por SIDA	Reducción de ATP y creatinina PO <sub>4</sub>	Corteza	30%
Enfermedad de Leigh	Complejo IV	Músculo	80%
Epilepsia mioclónica	Complejo I	Músculo	80-85%
	Complejo IV		85-95%
Encefalopatía mitocondrial (miopatía, acidosis láctica, trauma)	Complejo I	Músculo	80%
	Complejo IV		95%
Síndrome de Kearns-Sayre	Complejo IV	Músculo	85%

**Tabla I.3.1.** Cuadro esquemático de las alteraciones del metabolismo energético observadas en algunas enfermedades neurodegenerativas.

En los últimos años se han descrito diversas enfermedades asociadas al metabolismo energético en la mitocondria (Beal *et al.*, 1993), debido a que en su membrana interna se localiza la cadena transportadora de electrones (*figura I.3.1.*).

Defectos en alguno de los complejos de la cadena transportadora de las mitocondrias localizadas en diversas regiones cerebrales originan patogénesis conocidas como la enfermedad de Parkinson (Mizuno *et al.*, 1989; 1990; Schapira *et al.*, 1990; Bindoff *et al.*, 1991; Hattori *et al.*, 1991; Shoffner *et al.*, 1991; Mann *et al.*, 1992; Sims, 1996; Mamelak, 1997), Huntington (Brenuan *et al.*, 1985; Parker *et al.*, 1990a, Beal, 1992; Struys-Ponsar *et al.*, 1994; Sims, 1996; Borlongan *et al.*, 1997) o Alzheimer (Parker *et al.*, 1990b; Kish *et al.*, 1992; Mamelak, 1997; Mark *et al.*, 1997) debido a que disminuye el metabolismo energético mitocondrial.



**Figura I.3.1.** Diagrama esquemático de los cinco grandes complejos transportadores de electrones existentes en las mitocondrias (tomado de Beal *et al.*, 1993).

De igual forma, el metabolismo energético se ve afectado en casos de lesiones traumáticas del cerebro, como se demuestra en estudios histoquímicos que ponen de manifiesto una reducción de la actividad citocromooxidasa en animales sometidos a este tipo de lesiones (Hovda *et al.*, 1991).

Por otro lado se ha sugerido que durante el envejecimiento normal, existe un descenso progresivo en la actividad de la cadena transportadora de electrones (Trounce *et al.*, 1989; Yen *et al.*, 1989; Di Monte *et al.*, 1992). Además, el ADN mitocondrial es mucho más susceptible al daño ocasionado por radicales libres (Wallace, 1992a),

y esto se demuestra en estudios de tejido cerebral donde se observa un incremento progresivo con la edad en los marcadores del daño oxidativo en el ADN mitocondrial (Cortopassi y Arnheim, 1990; Corral-Debrinski *et al.*, 1992; Wallace, 1992a). Por tanto, ante un daño o lesión puede producirse un aumento en las alteraciones del envejecimiento normal en la cadena transportadora de electrones. Así, alteraciones en la función mitocondrial favorecen aún más la formación de radicales libres o aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, factores que también son especialmente responsables de la degeneración neuronal (Beal *et al.*, 1993; Sims, 1996).

### 3.3. NEUROTOXICIDAD DEBIDA A AMINOÁCIDOS EXCITADORES.

En los últimos años se ha comprobado la potente acción neurotóxica que poseen los aminoácidos acídicos en fenómenos de excitación neuronal, relacionado esto con procesos degenerativos de distinta etiología como hipoxia/isquemia, hipoglucemia, epilepsia, lesiones traumáticas (Olney *et al.*, 1971; Coyle, 1983; Choi, 1988a,b; 1992; Frandsen y Schousboe, 1990; Choi y Hartley, 1993) y otras enfermedades neurodegenerativas (Miyashita *et al.*, 1994), entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer (Palmer y Gershon, 1990; Shaw, 1992; Martínez-Martos *et al.*, 1996).

Olney observó por primera vez que el Glu monosódico, usado como aditivo en alimentos, era causa de la aparición de lesiones en el hipotálamo de recién nacidos (donde la barrera hematoencefálica no ha madurado suficientemente) (Olney, 1969). Posteriormente, se comprobó el efecto neurotóxico que tienen los aminoácidos excitatorios (Asp y Glu) y otras sustancias relacionadas con ellas como los ácidos caínico y quisquálico, el NMDA, el ácido iboténico, y el AMPA. La inyección de estos compuestos en tejido cerebral provoca lesiones neuronales localizadas a nivel postsináptico, habiendo una destrucción diferencial de las dendritas y cuerpos celulares mientras que los axones y las terminales se degeneran más tarde (Frandsen y Schousboe, 1990).

También se han hecho experimentos *in vivo* donde se ha demostrado que la excesiva exposición a la acción de estas sustancias puede ocasionar degeneración neuronal (Dichter y Choi, 1989; Choi, 1992; Choi y Hartley, 1993). Aún existiendo ciertos factores que impiden una valoración precisa del efecto tóxico, como la barrera hematoencefálica del adulto o mecanismos inactivadores metabólicos o de captación, el efecto tóxico de los aminoácidos excitadores puede aumentar por la acción aditiva de estos compuestos, aunque son liberados endógenamente tras la despolarización de terminales aminoacidérgicas (Dichter y Choi, 1989).

En cultivos celulares se puede definir de forma más precisa la concentración de estas sustancias añadidas al medio, valorando así su acción neurotóxica mucho mejor. Además, en estas condiciones los mecanismos de liberación o inactivación están atenuados (Dichter y Choi, 1989). De hecho en cultivos de células de la corteza se han observado que cinco minutos de exposición a una concentración cien veces menor de Glu que la obtenida de tejido en corteza de mamífero son suficientes para destruir la mitad de neuronas cultivadas sin que aparezca daño alguno en células gliales (Choi *et al.*, 1987). Otros aminoácidos o compuestos endógenos con una potencia similar son el Asp (Dichter y Choi, 1989) y homocisteico (Kim *et al.*, 1987). El quinolínicó, que no está sujeto aparentemente a inactivación por recaptación (Stone y Counick, 1985), es posible que sea tan potente como neurotoxina al ser inyectado *in vivo* (Schwarcz *et al.*, 1983), aunque cortas exposiciones de esta sustancia en cultivos corticales son más débiles que el propio Glu (Kim y Choi, 1987).

En estudios iniciales de caracterización de la neurotoxicidad de aminoácidos excitadores, Olney comprobó la existencia de una correspondencia entre el potencial neuroexcitador y neurotóxico de muchos compuestos (Olney *et al.*, 1971). Se propuso que la neurotoxicidad de aminoácidos excitadores sería consecuencia directa de la excesiva despolarización excitadora, tal vez asociada a una pérdida de la homeostasis iónica y/o a una depleción de las reservas energéticas de las células (Olney *et al.*, 1986). Esta hipótesis fue respaldada por estudios ultraestructurales, mostrando que los aminoácidos excitatorios inducían una hinchazón neuronal más marcada en dendritas y somas (dendrosomatotóxica), probablemente mediada por la presencia de altas concentraciones de receptores postsinápticos (Olney, 1978).

Se diferencian dos etapas durante la acción tóxica de los aminoácidos excitadores: una fase aguda y otra fase retardada (Choi, 1988a; Kato *et al.*, 1991):

- La fase aguda se caracteriza por una hinchazón neuronal aguda dependiente de los niveles de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> extracelulares, que puede ser mimetizada por otros agentes despolarizantes. La interacción del Glu con su receptor aumentaría la permeabilidad de la membrana al Na<sup>+</sup> produciendo una despolarización que arrastraría secundariamente Cl<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O al interior celular. La hinchazón observada podría reflejar el aumento de volumen que, llegado a un extremo, produciría cambios irreversibles y la posterior lisis celular (Martínez-Martos *et al.*, 1996).
- La fase retardada está marcada por un retraso en la desintegración neuronal y depende de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. De hecho, este mecanismo está mediado por una entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior de las neuronas y puede ser mimetizado por el Ca<sup>2+</sup>-ionóforo A23187. Esta entrada de calcio puede

producirse a través de canales iónicos operados por receptor o, indirectamente, a través de canales dependientes de voltaje activados por la despolarización de la membrana (Martínez-Martos *et al.*, 1996).

Ambos mecanismos pueden ocasionar daño neuronal irreversible de forma independiente o conjuntamente. No obstante, el mecanismo dependiente de calcio puede desencadenarse a un umbral más bajo de exposición, y predomina en la mayoría de las condiciones patológicas. En ambos casos, el receptor NMDA puede desempeñar un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores (Martínez-Martos *et al.*, 1996; Hartnett *et al.*, 1997).

Los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico son tóxicos por diversas razones que se reflejan en forma de alteraciones de un gran número de procesos biológicos regulados por dicho ión (Cheung *et al.*, 1986; Siesjo, 1988). Entre ellos se incluyen la activación de proteasas y lipasas, así como la generación de radicales libres. Además, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las terminales podría aumentar la liberación de aminoácidos excitadores endógenos y propagar el daño celular mediante un retrocontrol positivo (Dichter y Choi, 1989; Choi y Hartley, 1993; Martínez-Martos *et al.*, 1996). Y se sabe que cuando se produce la retirada de etanol se dan aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que pueden ser el resultado de la alta regulación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Whittington *et al.*, 1995).

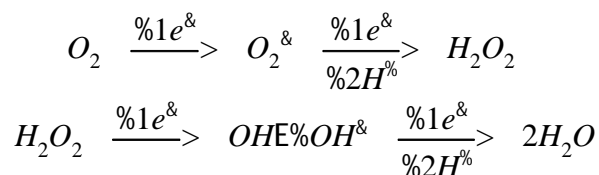
#### **3.4. PROCESOS NEURODEGENERATIVOS INDUCIDOS POR RADICALES LIBRES.**

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen un orbital con un electrón desapareado (Halliwell y Gutteridge, 1985b) y están caracterizados por tener una vida corta (Nordmann y Rouach, 1996), consecuentemente son mucho más inestables y mucho más reactivos, y para completar su orbital son capaces de extraer electrones de las moléculas vecinas generando nuevos radicales, los cuales pueden ser más o menos reactivos que el radical original (Cheeseman y Slater, 1993; Reiter *et al.*, 1998). Luego se inicia una reacción en cadena que puede dañar gran cantidad de moléculas biológicas vitales y llevar a un daño severo (Halliwell, 1992). De entre varios tejidos, el cerebro parece ser particularmente sensible a los efectos dañinos de la generación de estos radicales, que pueden venir por diferentes reacciones de transferencia de electrones, especialmente las de fosforilación oxidativa y la de oxidación del ácido araquidónico, DA y xantina (Lees, 1993). En 1993, Evans revisó los factores de la gran vulnerabilidad del cerebro, entre ellos destacan el alto índice de la actividad metabólica oxidativa, la alta concentración de sustratos fácilmente oxidables, como los lípidos de membrana, las proteínas celulares esenciales y los ácidos nucleicos, que provocan en la célula mutaciones genéticas de gran importancia

(Halliwell y Gutteridge, 1984; Lees, 1993), y por último el bajo nivel de algunos enzimas protectores (catalasa y glutatión peroxidasa).

El SNC es bastante vulnerable al estrés oxidativo y especialmente sensible al daño producido por radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1985a) debido a que los fosfolípidos de las membranas neuronales, ricas en ácidos grasos poliinsaturados; son los mayores blancos del estrés oxidativo (Nordmann y Rouach, 1996); son dañados (oxidados) induciendo peroxidación lipídica (Uysal *et al.*, 1989; Nordmann *et al.*, 1990; Montoliu *et al.*, 1994), que altera la integridad estructural de la membrana celular (Halliwell y Gutteridge, 1985a) incluso pudiendo provocar la muerte de la célula (Olanow, 1993; Davis, 1996; Farooqui *et al.*, 1997; Floyd, 1997). También se debe al alto índice metabólico del SNC, con el gran uso de oxígeno y la disminución de la actividad del pobremente desarrollado sistema de defensa antioxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1985a; Poeggler *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1995; Sewerynek *et al.*, 1995). Aunque los radicales de oxígeno generados como productos del metabolismo celular se mantienen a muy bajo nivel (no tóxico), con la ayuda de los mecanismos antioxidantes (Cross, 1987; Jenner, 1994).

La patofisiología de una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas resulta del daño producido por la formación de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1989; McCord, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Reiter *et al.*, 1998) y la consecuente peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 1985a). Diferentes estudios han detectado niveles anormales de radicales libres tras periodos de isquemia (Schmidley, 1990), en pacientes con Parkinson (Dexter *et al.*, 1989; Jenner *et al.*, 1992) o Alzheimer (Jeandel *et al.*, 1989; Andorn *et al.*, 1990; Subarao *et al.*, 1990; Davis, 1996), así como en el envejecimiento normal (Mizuno *et al.*, 1989; 1990). Generalmente los radicales libres provienen del oxígeno, como el radical OH<sup>•</sup>, que es altamente reactivo, y el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), además del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formado durante la fosforilación oxidativa llevada a cabo en la reducción de la molécula de oxígeno hasta agua (H<sub>2</sub>O) (Nordmann y Rouach, 1996).



Para prevenir los efectos dañinos de los radicales, las células tienen defensas eficientes para prevenir la generación de estos radicales o para interceptar aquellos que se forman. Estas defensas pueden ser enzimáticas o no enzimáticas y se localizan

en compartimentos celulares acuosos o de membrana (Cheeseman y Slater, 1993; Niki, 1993; Sies, 1993). Debido a la presencia de estos antioxidantes, el nivel de radicales en diferentes compartimentos celulares se mantiene controlado y a bajos niveles. La ruptura del equilibrio provoca un incremento en la formación de radicales libres, denominada estrés oxidativo (Sies, 1985). Los mecanismos que previenen o limitan la producción de radicales libres y, por tanto, el daño tisular parecen ser varios (Olanow, 1993):

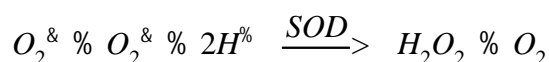
- Uno de los mecanismos de defensa es el hecho de que la fosforilación oxidativa tenga lugar principalmente en el interior de las mitocondrias, orgánulos rodeados de doble membrana, por lo que las especies oxidantes quedan retenidas e inactivadas dentro del orgánulo al ser reducidas a H<sub>2</sub>O.
- Enzimas que participan en la defensa antioxidante son varias, pero especialmente la superóxido dismutasa (SOD) está implicada en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de los radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Por otro lado están la catalasa y la glutatión peroxidasa, implicadas en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y la glutatión-S-transferasa que contribuye a la eliminación de los productos resultantes de la peroxidación lipídica (Nordmann y Rouach, 1996).
- Uno de los antioxidantes no enzimáticos es el α-tocoferol (vitamina E), que se conoce como el mayor antioxidante soluble en lípidos que rompe cadenas en las membranas biológicas (Packer y Kagan, 1993). Las propiedades antioxidantes del α-tocoferol van unidas a su habilidad para donar un átomo de hidrógeno a un radical peróxido, y va a interferir con la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. El ascorbato y el glutatión interaccionan con el α-tocoferol en la protección contra el daño oxidativo contribuyendo a la generación de α-tocoferol desde sus derivados de radicales libres (Reed, 1993). No obstante, el ascorbato, que suele actuar como un preoxidante a baja concentración y como antioxidante a altas concentraciones, parece tener un papel protector contra la peroxidación lipídica en el cerebro. En la regeneración del α-tocoferol, el glutatión puede coger los radicales libres o contribuir a la defensa antioxidante como sustrato de la glutatión peroxidasa, de la reductasa o de la glutatión-S-transferasa. Debido a esto, tanto el α-tocoferol como el ascorbato o el glutatión en el cerebro han sido considerados como índices indirectos de estrés oxidativo (Nordmann y Rouach, 1996). Existen evidencias que muestran cómo estos agentes antioxidantes disminuyen el daño degenerativo asociado a isquemias o traumas (Oliver *et al.*, 1990; Clemens *et al.*, 1991; Floyd y Carney, 1992; Hall, 1992; Tagaya *et al.*, 1992), excitotoxinas (Beal *et al.*, 1988; Miyamoto y Coyle, 1990; Monyer *et al.*, 1990; Favit *et al.*, 1992; Puttfarcken *et al.*, 1992; Kok, 1997) y β-

amiloides (Behl *et al.*, 1992). No obstante, esta protección sólo es parcial en células cerebrales ya que su contenido en agentes antioxidantes es muy reducido (Olanow, 1992; Rosen *et al.*, 1993).

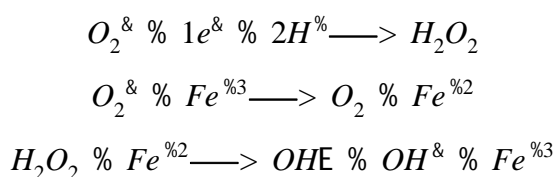
- Otro mecanismo de defensa lo forman las proteínas que unen metales capaces de promover las reacciones redox, manteniéndolos en estado no reactivo. Entre estas proteínas se encuentran la ferritina y la transferrina (Dexter *et al.*, 1992; Olanow, 1993; Gassen y Youdim, 1997).

Estos han sido implicados como mediadores del daño oxidativo en tejido neuronal en varias condiciones patológicas (Gotz *et al.*, 1990; Siesjo, 1992; Sewerynek *et al.*, 1995).

En la toxicidad mediada por el radical  $O_2^-$ , la SOD tiene especial importancia debido a que cataliza la reacción de formación de  $H_2O_2$  y oxígeno molecular a partir de radicales  $O_2^-$ :



Los mecanismos responsables del daño tisular asociado a una disminución en la actividad SOD no han sido definidos (Olanow, 1993; Fernández-Novoa *et al.*, 1997) y la toxicidad debida al propio  $O_2^-$  es probablemente menor que la debida al  $OH^-$ , ya que este último es muy reactivo. No obstante, el exceso de  $O_2^-$  ocasiona un aumento en la formación del radical  $OH^-$ . Se ha supuesto que un posible mecanismo degenerativo pueda ser la reacción de Haber-Weiss, catalizada por hierro.



Esta reacción está catalizada por sistemas biológicos mediante la transición de metales, especialmente el hierro. Solamente una pequeña fracción del hierro que está en las células actúa como catalizador en esta reacción. Se representa por derivados de hierro de bajo peso molecular (hierro libre, que no está en ningún compartimento), el resto de hierro está secuestrado en las proteínas que lo almacenan, principalmente la ferritina (Aust *et al.*, 1985).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede participar en reacciones catalizadas por metales de transición generando  $\text{OH}^\cdot$ , que es un oxidante muy fuerte que puede iniciar la peroxidación lipídica y la cadena de reacción de radicales (Reiter *et al.*, 1993; Karuzina y Archakov, 1994; Sewerynek *et al.*, 1995).

A su vez, el  $\text{O}_2^\cdot$  originaría también radicales  $\text{OH}^\cdot$  por una interacción con el óxido nítrico (NO) formado endógenamente (Beckman *et al.*, 1990), que puede jugar un papel importante en la excitotoxicidad (Nordmann y Rouach, 1996). Esta interacción llevaría a la formación de intermediarios como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ), que puede causar daños en el tejido por oxidación de residuos Met en proteínas y péptidos, tioles y tioésteres (Koppenol *et al.*, 1992; Moreno y Pryor, 1992). El  $\text{ONOO}^\cdot$  también puede provocar la muerte neuronal al reaccionar con la SOD (Beckman *et al.*, 1990). Tanto el  $\text{O}_2^\cdot$  como el NO se pueden generar en respuesta a un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico. Así, el  $\text{Ca}^{2+}$  activaría a la enzima NOS, produciendo NO (Galpern *et al.*, 1996), y a una proteasa que transforma la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que actúa como catalizador de la reacción de oxidación de la xantina originando un aumento en los niveles de  $\text{O}_2^\cdot$  (Olanow, 1993). Esta reacción se ha propuesto como mediador de la toxicidad asociada a aminoácidos excitatorios y a procesos isquémicos, ya que en ambos existe un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (McCord, 1985; Dawson *et al.*, 1992). Además el cerebro contiene altas concentraciones de hierro y ácido ascórbico, que bajo ciertas condiciones, como la mala regulación, pueden contribuir a la generación de estos radicales libres.

### **3.5. INTERACCIONES ENTRE LOS POSIBLES MECANISMOS QUE CAUSAN CITOTOXICIDAD EN EL CEREBRO.**

Los radicales libres, como se ha dicho previamente, también pueden modificar y fragmentar las proteínas celulares, siendo capaces de acelerar la proteólisis dentro y fuera de las células (Wolff *et al.*, 1986). Muchas proteínas, especialmente las enzimas, son sensibles a los radicales derivados de  $\text{O}_2$  (Davies, 1987). La oxidación de grupos -SH de las enzimas clave, inducida por radicales libres, puede contribuir a la perturbación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual puede mediar la muerte celular por la disrupción del citoesqueleto, fragmentación del ADN y por daños extensivos a otros componentes celulares (Orrenius *et al.*, 1989; Orrenius, 1993).

Todos los mecanismos causantes de degeneración neuronal no son independientes, sino que se encuentran estrechamente ligados. Uno de los posibles lazos de unión lo constituye la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , una enzima que es el mayor o más importante consumidor de energía del cerebro (Erecinska y Silver, 1989; Ames *et al.*,

1992) y cuya función es mantener y restaurar los gradientes iónicos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana de las células nerviosas. También desempeña un papel fundamental en procesos como el mantenimiento del volumen celular, la excitabilidad de la membrana y la recaptación de neurotransmisores (Stahl, 1984; 1986; Lees, 1991).

Estudios *in vivo* han demostrado que descensos en la actividad de este enzima provocan neurotoxicidad (Lees *et al.*, 1990). Las causas que pueden provocar fallos en la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  son numerosas. Así, durante procesos isquémicos o hipoglucémicos su actividad se ve alterada por un descenso en la disponibilidad de su sustrato (ATP), así como por la producción o incluso la acumulación de inhibidores en elevadas proporciones (Lees, 1991). El propio  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede actuar como un potente inhibidor fisiológico de este enzima (Yingst, 1988; Matsuda *et al.*, 1992), particularmente cuando su concentración está notablemente incrementada tras algún tipo de agresión o por activación de los receptores de Glu (Choi, 1988a,b; Choi y Hartley, 1993). De igual modo, la actividad ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se ve afectada en estados neuropatológicos por la disminución en la liberación energética debida a la baja disponibilidad de sustratos ricos en energía (Lees, 1993).

Los mecanismos por los cuales las variaciones en la actividad ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  podrían potenciar la muerte neuronal son el resultado indirecto de la relación de este enzima con la regulación del volumen celular, el potencial de membrana y, especialmente, su función en el mantenimiento de un gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana celular. Esta última función controla el transporte de un elevado número de solutos orgánicos de gran importancia fisiológica, así como de iones a través de la membrana citoplasmática (Lees *et al.*, 1990; Nicholls y Attwell, 1990). Concretamente este gradiente controla la recaptación de Glu y otros compuestos como la DA, que afecta a la toxicidad del Glu y regula la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre por el mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

El enzima ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  también es fundamental para el mantenimiento de la diferencia de potencial en las membranas (Thomas, 1972; García *et al.*, 1997). La despolarización que sucede tras los descensos en la actividad de este enzima puede ocasionar la activación de los receptores NMDA voltaje-sensibles, normalmente inactivados (Mayer y Westbrook, 1987), por tanto no sólo existe un incremento en la liberación de Glu sino que también se activan los receptores de este aminoácido (Lees, 1993).

Otro defecto descrito tras la inhibición de este enzima es la disminución del pH intracelular ocasionada por el aumento de la concentración de  $\text{K}^+$  intracelular que bloquea al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Esta acidosis puede ser letal para las neuronas y

---

especialmente para las células gliales (Tombaugh y Sapolski, 1990; Nedergaard *et al.*, 1991).

Otro dato a tener en cuenta es la estrecha relación existente entre la producción de radicales libres ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y NO) y las alteraciones que tienen lugar en la cadena transportadora de electrones (Bandy y Davison, 1990; Shoffner *et al.*, 1991; Davis, 1996; Multhaup, 1997; Samdani *et al.*, 1997).

El ADN mitocondrial se encuentra unido a la membrana interna de la mitocondria y es especialmente susceptible al ataque de radicales libres como el NO (Wink *et al.*, 1991), que produce mutaciones por desaminación, y el  $H_2O_2$ , especialmente cuando las enzimas requeridas para la inactivación de estas especies reactivas y para la reparación del daño se encuentran en bajas concentraciones en el interior de la mitocondria (Richter *et al.*, 1988; Bandy y Davison, 1990). Además, este ADN con mutaciones es capaz de replicarse más rápidamente que el ADN normal, por lo que alcanza elevados niveles (Wallace, 1992b).

Por otro lado, el NO, en condiciones normales, tiene funciones fisiológicas importantes, incluso el control de la vasodilatación (Garthwaite, 1991; Vicent y Hope, 1992). Pero la generación de este radical puede ser dañina en las células debido a sus propias propiedades de radical libre y/o a través de la formación de más radicales libres. También se puede combinar con el  $O_2^-$  para formar el anión  $ONOO^-$ . Como las células son capaces de generar  $O_2^-$  y NO, el  $ONOO^-$  puede ser generado en exceso durante la exposición al alcohol.

En ciertas regiones cerebrales la producción de NO por la NOS puede verse favorecida por la acción del Glu sobre los receptores NMDA, debido probablemente a un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Garthwaite, 1991; Dawson *et al.*, 1992; 1994; Lees, 1993) o de sodio (Strijbos *et al.*, 1996). El flujo de calcio mediado por receptores NMDA induce la síntesis de NO vía activación de la NOS, que es dependiente del sistema calcio/calmodulina y que está regulado por la PKC (Schuman y Madison, 1994). La actividad de los receptores NMDA tiene como resultado la producción de especies reactivas al NO,  $NO^+$  y  $NO^-$  (Choi, 1988b; Garthwaite *et al.*, 1988; Stammler *et al.*, 1992), y es que la biosíntesis de estas en el cerebro parece estar fuertemente unida a la actividad del receptor NMDA (Crews y Chandler, 1993; Lancaster, 1993).

Del mismo modo el NO puede actuar sobre el metabolismo energético, inhibiendo la aconitasa del ciclo de Krebs y a los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones (Drapier y Hibbs, 1988), acentuando así las deficiencias

energéticas ocasionadas tanto por fallos en los enzimas o en los sustratos ricos en energía, ya descritos en enfermedades degenerativas (Lees., 1993). Esta inhibición del metabolismo energético puede causar la liberación del Glu tanto en neuronas como en las células gliales (Sasaki *et al.*, 1997). Todas estas relaciones quedan esquematizadas en la *figura I.3.2*.

Por último conviene citar el importante papel que desempeñan las células gliales en los procesos degenerativos (Kochanek y Hallenbeck, 1992; Lees, 1993; Sasaki *et al.*, 1997) debido a la liberación de citotoxinas tales como radicales libres, NO y factores de necrosis tumoral (TNF). Los astrocitos son de igual modo capaces de producir TNF $\alpha$  y NO.

De acuerdo con las hipótesis actuales de los mecanismos responsables de la neurodegeneración, basadas en las consecuencias de los elevados niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, Robbins y colaboradores (1987) sugirieron que la inducción de elevados niveles de Ca<sup>2+</sup> en el interior de células no neuronales podría causar, de forma indirecta, la muerte neuronal por liberación de citotoxinas. Es importante destacar la necesidad de la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje de tipo L y la presencia de calmodulina (Wright *et al.*, 1985a) para la producción, en algunas líneas de macrófagos, de citotoxinas.

Para concluir, se ha observado que el incremento prolongado de la concentración del calcio libre citosólico constituye el proceso crítico que lleva a la neurodegeneración (Choi, 1988a,b; 1992; Choi y Hartley, 1993; Martínez-Martos *et al.*, 1996), ya que se requiere este ión en la activación de la NOS (Garthwaite, 1991) y otras enzimas degradativas implicadas en la lisis celular (Choi, 1988a,b; 1992; Orrenius *et al.*, 1992; Choi y Hartley, 1993); y probablemente también para la formación de radicales libres (Chan *et al.*, 1985; Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1988; 1990; Beckman *et al.*, 1990), para iniciar la apoptosis (Martin y Cotter, 1991) y para la síntesis y degradación de citotoxinas en células no neuronales (Lees, 1993).

También se debe resaltar la importancia del conocimiento de los mecanismos moleculares que dan lugar a los distintos procesos neurodegenerativos, ya que permite el estudio y desarrollo de nuevas sustancias con función neuroprotectora (Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998).

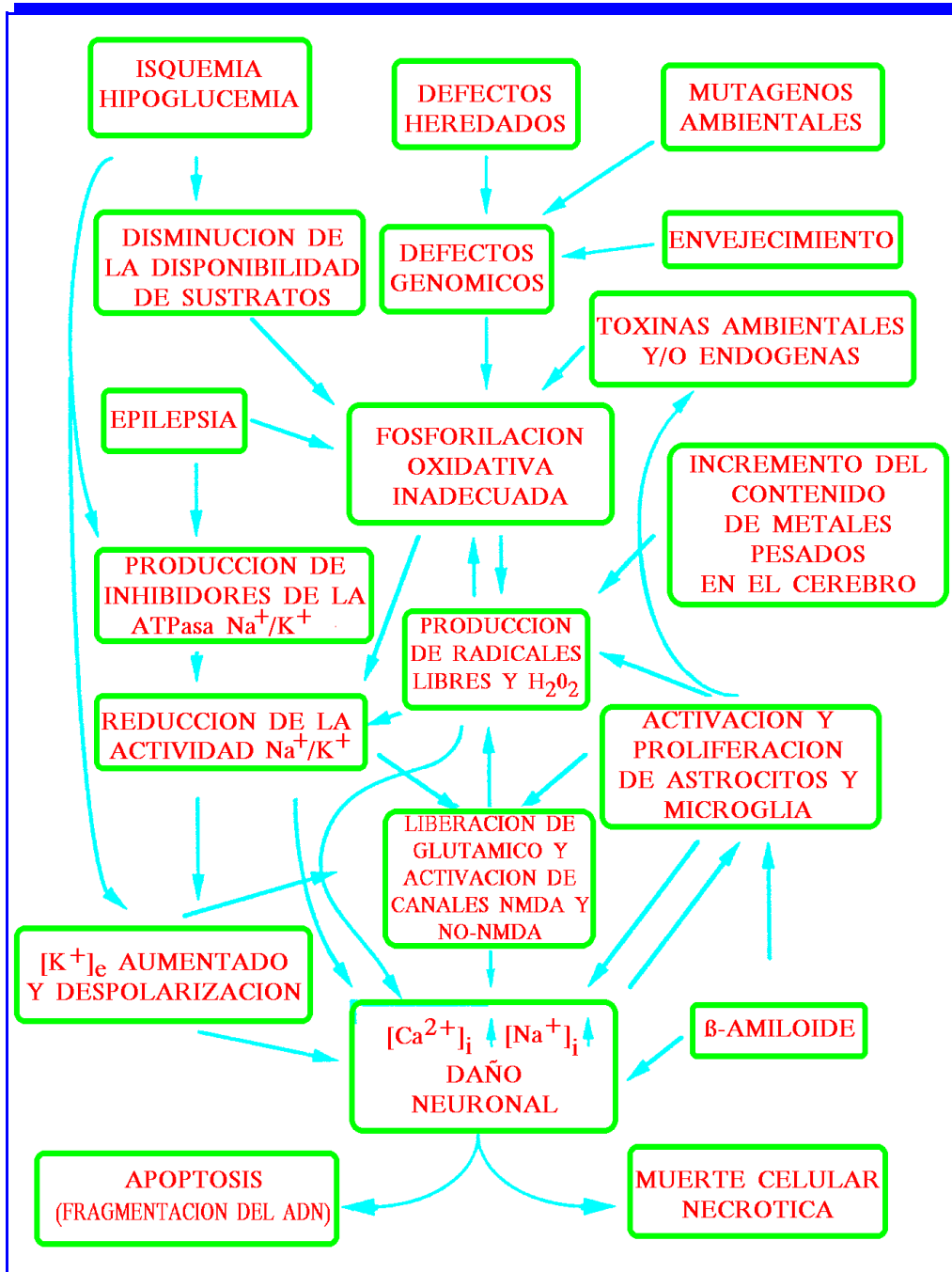


Figura I.3.2. Cascada de acontecimientos que participan en los procesos degenerativos del SNC (tomado de Lees, 1993).

### **3.6. LAS AMINOPEPTIDASAS EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.**

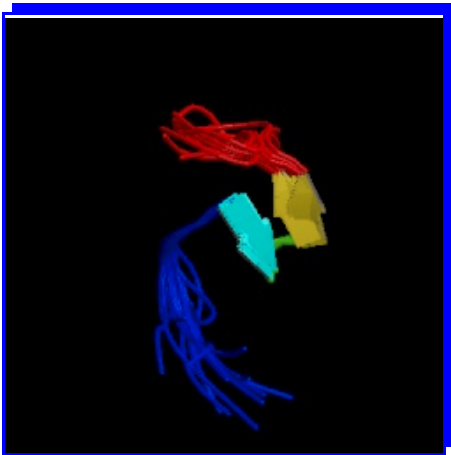
Se conoce muy poco sobre el papel de los enzimas proteolíticos del tipo de las AP en los procesos neurodegenerativos del SNC, a pesar de la importancia que supone conocer tanto los procesos catabólicos de los neuropéptidos, debido a que su mal funcionamiento puede ser responsable de muchos de los fenómenos que ocurren en distintos tipos de procesos neurodegenerativos, como los procesos de degradación intracelular de proteínas. El grupo de Mantle y colaboradores ha sido el más incidente en este terreno. Así, han llevado a cabo una investigación sistemática sobre los niveles de estos enzimas en distintas regiones corticales (occipital, frontal, temporal y parietal) de cerebro humano de individuos controles y afectados de enfermedad de Alzheimer, no encontrado variaciones significativas en las actividades estudiadas (Mantle *et al.*, 1989; Mantle y Perry, 1990). Por el contrario, si que han encontrado incrementos significativos de los niveles de ciertas AP lisosomales como la ArgAP y la catepsina D, en enfermos de Huntington, sugiriendo un papel potencial para estos enzimas en la patogénesis de la enfermedad (Mantle *et al.*, 1995). Por otro lado, Kaneko y colaboradores han sugerido que la formación de placas seniles, implicadas en la neurodegeneración propia de la enfermedad de Alzheimer, podría deberse a un mecanismo que involucra a las proteasas cerebrales y que permitiría la incorrecta degradación de dichas placas (Kaneko *et al.*, 1995).

El estudio de los procesos neurodegenerativos inducidos por iones metálicos también ha demostrado el papel de las AP en el mantenimiento de un intercambio proteico adecuado. Así, la intoxicación con diferentes iones metálicos mostró en cerebro humano un claro efecto inhibitor del  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  sobre alguno de estos enzimas, mientras que otros eran fuertemente activados. Se sugiere además que el enzima pGluAP es el más firme candidato a promover la neurodegeneración inducida por intoxicación con iones metálicos (Falkous *et al.*, 1995).

La mayor parte de los estudios llevados a cabo sobre los procesos neurodegenerativos del SNC en relación con los sistemas neurotransmisores, se han centrado, como se ha visto en este capítulo, en el estudio de los aminoácidos excitadores. Puesto que los enzimas AspAP y GluAP pueden modificar la concentración de ácidos Asp y Glu, modificaciones en su actividad podrían estar relacionada con la toxicidad inducida por estos neurotransmisores. Estudios llevados a cabo por nuestro laboratorio y por otros autores en animales envejecidos como modelo de degeneración, han demostrado variaciones significativas de esta actividad en la corteza frontal, parietal y occipital y menores en corteza temporal (Iribar *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 1995). Se apoya, por tanto, la idea de que las AP son

importantes para una correcta homeostasis del intercambio proteico cerebral y que sus modificaciones pueden influir en la aparición de neurodegeneración.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la producción excesiva de proteína  $\beta$ -amiloide (*figura I.3.3.*) podría deberse a la existencia de un mecanismo que provoca la inhibición de su degradación. Ya se había propuesto que la proteólisis de la proteína  $\beta$ -amiloide por las AP podría limitar la velocidad del catabolismo de esta proteína y que una cierta reducción de la actividad AP sería la responsable de este catabolismo y su deposición, hablándose de una hipótesis por las AP en los procesos neurodegenerativos inducidos por deposición de  $\beta$ -amiloide. Existen varias



**Figura I.3.3.** Estructura del  $\beta$ -amiloide.

observaciones clínicas y experimentales que soportan esta hipótesis, aunque queda por evaluar la relevancia de estos desórdenes proteolíticos en los procesos neurodegenerativos (Saido, 1998). De hecho, nuevos estudios sobre enfermos de Alzheimer llevados a cabo con un número de casos más elevado que los realizados inicialmente por Mantle y colaboradores, y teniendo en cuenta la influencia de la acidosis hipóxica originada durante la muerte, ha demostrado que existe un incremento significativo de la actividad de AlaAP en estos enfermos (Terwel *et al.*, 1998).

## **4. LA CORTEZA FRONTAL DE ROEDORES.**

### **4.1. INTRODUCCIÓN.**

Esta bien demostrado que la corteza cerebral contiene un elevado número de áreas que funcionan a múltiples niveles a la hora de procesar las señales dentro de los distintos sistemas sensoriales y motores. Más aún, cada vez hay más evidencias de que las funciones superiores están distribuidas por diferentes localizaciones, entre las que está la corteza. Por tanto, el papel funcional de una determinada región cortical se debe tanto a la organización interna de sus circuitos sinápticos como a las distintas conexiones existentes con otras regiones corticales y subcorticales (Shepherd, 1994).

La corteza cerebral de mamíferos está constituida por cuatro regiones principales: occipital, parietal, temporal y frontal. Si bien es cierto que la mayoría de las funciones corticales dependen de interacciones entre áreas de las distintas regiones. A continuación nos centramos en la descripción de los conocimientos de la región frontal.

### **4.2. ESTRUCTURA DE LA CORTEZA FRONTAL.**

La corteza del polo frontal de roedores comprende varias regiones citoarquitectónica y electrofisiológicamente diferentes. Dependiendo del autor y de los criterios utilizados han recibido diferentes denominaciones.

Desde el punto de vista citoarquitectónico la corteza cerebral de mamíferos se puede considerar dividida en dos grandes zonas: la isocorteza, que presenta las típicas 6 capas corticales bien diferenciadas, y la allocorteza, con una organización laminar más heterogénea y en la que pueden faltar algunas de las capas. Evolutivamente las zonas de isocorteza corresponden al neocortex y las de allocorteza corresponden por una parte al archicortex, que tiene asignadas funciones límbicas, y por otra al paleocortex, que tiene asignadas funciones olfatorias.

A diferencia de las regiones occipital y temporal, la corteza frontal es difícil de definir y delimitar por los impulsos predominantes que recibe desde los diferentes sistemas sensoriales. Esta característica ha conducido a un profundo debate sobre las equivalencias existentes para este área entre distintas especies (Uylings y Van Eden, 1990).

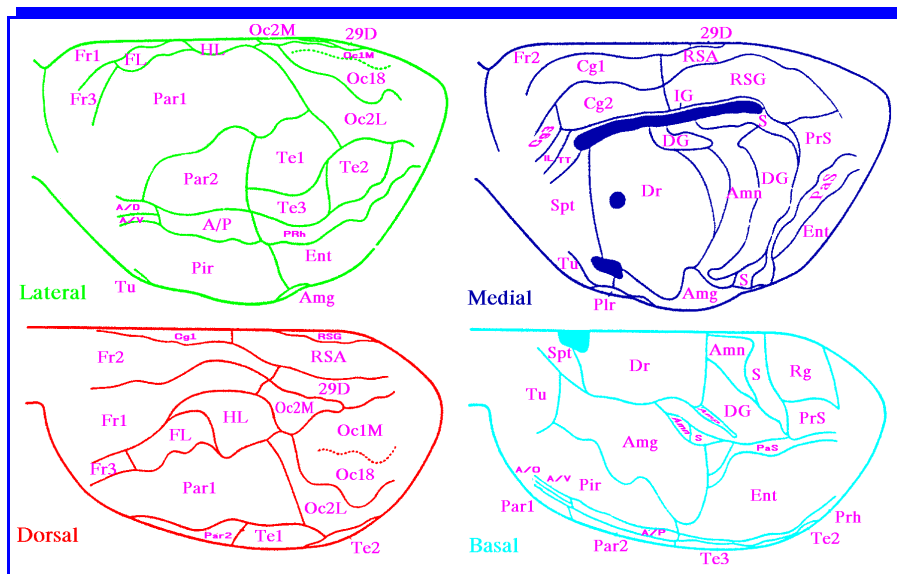
En mamíferos, el lóbulo frontal se ha dividido históricamente en dos regiones: una región posterior que correspondería al giro precentral de homínidos, que provoca movimientos al estimularlo eléctricamente y fuertes déficits motores cuando se extrae, y otra región más rostral que no provoca ninguno de los efectos anteriores (Kolb, 1984).

Esta fuerte división funcional, inicialmente delineada en primates, se relaciona con la diferenciación anatómica propuesta por Brodmann (1909) para esta zona de la corteza. Dicho autor diferenció una zona rostral caracterizada por la presencia de una gruesa capa granulosa IV y otra zona posterior que no mostraba esta marcada capa granulosa. De esta forma, en primates, y desde el punto de vista citoarquitectónico, se distinguen dos grandes áreas para la corteza frontal, la corteza granular que corresponde a la región rostral, y la corteza agranular correspondiente a la zona posterior. La corteza granular también es denominada como prefrontal y premotora para diferenciarla desde el punto de vista electrofisiológico de la corteza agranular o motora.

No obstante, en especies evolutivamente inferiores a los primates, caso de animales lisencéfalos como los roedores, la diferenciación propuesta en estas dos grandes zonas tiene el problema de que en la región rostral no aparece la típica capa granulosa IV. Este hecho ha conducido a definir esta región por sus conexiones, no por su citoarquitectura. Así, diferentes estudios llevados a cabo con técnicas de degeneración retrógrada, han permitido identificarla de manera equivalente en diferentes especies de mamíferos, como el campo de proyecciones del MD (Rose y Woolsey, 1948; Leonard, 1969). A pesar de que esta definición ha sido útil en los últimos 30 años, recientemente se han propuesto otras denominaciones basadas en el empleo de nuevas técnicas electrofisiológicas y neuroanatómicas que permiten una mejor correspondencia morfofuncional interespecífica (Uylings y Van Eden, 1990).

Otros estudios tratan de aunar información procedente de diferentes campos de la neurobiología tales como el citoarquitectónico, el electrofisiológico o aquel que abarca el tema de las conexiones con otras zonas cerebrales. Tal es el caso de los estudios llevados a cabo por Zilles y Wree (1985) mediante técnicas de cuantificación y análisis automático de imágenes. Los autores proponen un mapa completo de la corteza cerebral de rata (*figura 1.4.1.*) en el que la parte

correspondiente a la corteza del polo frontal, objeto de nuestro estudio, aparece dividida fundamentalmente en dos grandes áreas: la corteza cingulada anterior, que podría considerarse equivalente a la zona rostral, corteza prefrontal o premotora de primates; y la región frontal que se correspondería con la zona posterior o corteza motora.



**Figura I.4.1.** Mapa de Zilles y Wree (1985), en el que se pueden apreciar las diferentes zonas citoarquitectónicas del cerebro de roedores.

#### 4.2.1. Corteza Cingulada Anterior.

Este área se encuentra dividido en cuatro sectores denominados cingulado 1, 2 y 3 (Cg1-3) e infralímbico (IL). Estas zonas, identificadas con la corteza prefrontal de homínidos citoarquitectónicamente, no presentan la capa granulosa IV que caracteriza este mismo área en los primates más evolucionados. La identificación de la corteza prefrontal en roedores fue realizada por Leonard (1969) mediante estudios de degeneración retrógrada. Como ya se ha indicado anteriormente, fue catalogada como el campo de proyecciones del MD (Leonard, 1969).

En la *tabla I.4.1.* se indican las equivalencias entre las nomenclaturas empleadas por diferentes autores y los criterios de clasificación empleados en cada caso.

Zilles y Wree'85	Krettek y Price'77	Vogt y Peters'81	Krieg'86	Leonard'67	Kolb'84	Zilles y col'80
Citoarquitectura	Citoarquitectura	Citoarquitectura	Citoarquitectura	Conexiones	Funcional	Citoarquitectura
Cg1	Acd	24a	24	Campo de proyecciones del MD	Medial Frontal	C1
Cg2	Ac <sub>v</sub>	24b			Conocimiento y memoria	C2
Cg3	PL		32			C4
IL	IL		25		Tareas de Coordinación	C3

**Tabla I.4.1.** Equivalencias entre las denominaciones más comunes, asignadas a la corteza cingulada anterior (corteza prefrontal) de roedores, según diferentes criterios y autores.

La corteza cingulada es el mayor componente del sistema colinérgico, siendo este hecho puesto de manifiesto mediante ensayos de la actividad colinesterasa (Lewis y Shute, 1967) y por técnicas de marcaje inmunocitoquímico para AChE (Johnston *et al.*, 1981) y colinacetiltransferasa (ChAT) (Houser *et al.*, 1983).

Funcionalmente la ablación de la zona conduce a un déficit en los procesos de conocimiento, incluyendo demora en la realización de tareas y alteraciones del comportamiento social y afectivo (Eichenbaun *et al.*, 1983). En animales se ha comprobado que estas lesiones reducen la expresión de episodios de agitación en casos de frustración. Se ha demostrado además que esta zona está fuertemente interconectada con la corteza parietal, desde donde recibe la información visual y espacial (Goldman-Rakic, 1987). Además, está relacionada con la llamada “memoria de trabajo” y, extrapolando a humanos, es la zona afectada en los enfermos esquizofrénicos (Goldman-Rakic, 1991).

#### 4.2.2. Región Frontal.

En roedores esta región corresponde a una región isocortical, que desde el punto de vista citoarquitectónico se encuentra dividida en tres áreas diferentes denominadas como frontal 1, 2 y 3 (Fr1-3). Estas están rodeadas por un lado de la corteza cingulada anterior, limitando al otro lado con la corteza insular agranular. La delimitación de Fr1 y Fr3 resulta más reciente, ya que solo es posible llevarla a cabo mediante medidas de densidad neuronal (Zilles y Wree, 1985). El bajo índice de densidad neuronal en capa IV de Fr1 y Fr2 parece ser una característica de las áreas motoras agranulares en comparación con las áreas sensoriales primarias de la isocorteza de roedores.

Las conexiones de las áreas isocorticales han sido estudiadas por un gran número de investigadores (Zilles y Wree, 1985), existiendo unanimidad en que se trata de zonas que corresponden con la corteza motora. Mediante estudios de microestimulación y conectividad se ha determinado que Fr1 y Fr3 corresponden a la corteza motora primaria de la rata, denominada también como M1 (Shepherd, 1994).

Desde el punto de vista funcional una parte de Fr2 contiene la representación motora de los músculos de los ojos y párpados, el resto se encarga de la coordinación motora de la lengua, labios y mandíbula. Finalmente, Fr1 y Fr3 coordinan miembros, vibrisas, tronco y zona rinal (Hall y Lindholm, 1974). En la *tabla I.4.2.* se representa un cuadro indicativo de las denominaciones que han recibido estas zonas según diferentes criterios y autores.

Zilles y Wree'85	Krettek y Price'77	Krieg'46	Kolb'83	Donowhue y Wise'82	Zilles y col'80
Citoarquitectura	Citoarquitectura	Citoarquitectura	Funcional	Electrofisiología	Citoarquitectura
Fr2	Prcm	4	(Proy/ojos) Premotora	Am Anterior medial	Prcm, Prc3
Fr1	PrcL (Prc1)	6, 8, 8a, 10, 11	Corteza motora primaria (M1)	Ag1 Frontal agranular	Prc1, Prc2
Fr3					

**Tabla I.4.2.** Nomenclatura asignada a las diferentes partes de la región frontal según distintos criterios y autores.



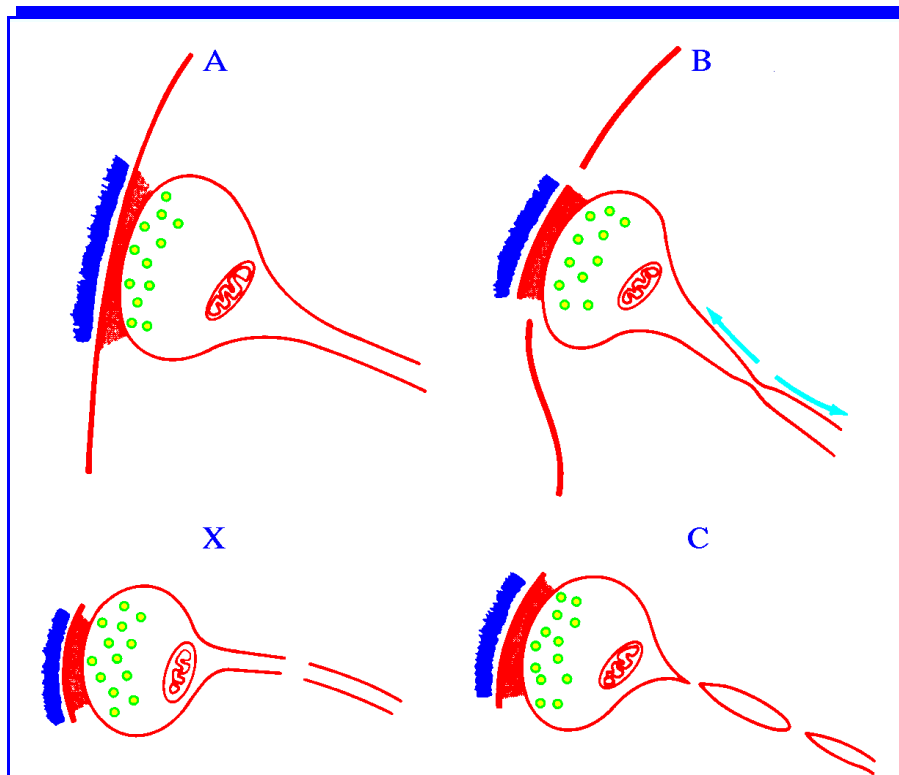
## 5. SINAPTOSOMAS.

### 5.1. INTRODUCCIÓN.

La utilización *in vitro* de la totalidad del tejido nervioso para el estudio de los mecanismos de síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores es limitada debido a la proporción relativamente pequeña de terminales sinápticas (entre un 5% en la corteza cerebral y un 30% en hipocampo) (Cragg, 1975). Esto crea un problema de ambigüedad en la identificación de los compartimentos que están involucrados en estos fenómenos, ya que no puede eliminarse la participación glial y no sináptica del resto de la neurona. En teoría este problema se podría resolver aplicando agentes que modularan la liberación sináptica sin influir en otros compartimentos tisulares, pero en la práctica los resultados son equívocos (Bradford, 1988). Estos problemas han sido eliminados en gran parte con la utilización de sinaptosomas.

Los preparados de sinaptosomas son fracciones subcelulares de tejido nervioso que comprenden, de forma intacta, gran parte de los terminales nerviosos presinápticos, tras haber sido separadas sus membranas en el punto de unión con el axón (*figura 1.5.1.*). Estos sinaptosomas, en las condiciones adecuadas, son metabólicamente activos (Bradford, 1988).

A partir de homogeneizados cerebrales se pueden aislar fracciones de tejido nervioso enriquecidas en sinaptosomas, utilizando técnicas de centrifugación en gradiente de sacarosa (De Robertis *et al.*, 1962; Gray y Whittaker, 1962; Hajos, 1975; Martínez-Martos *et al.*, 2000). Estos preparados tisulares son ricos en componentes moleculares y en estructuras morfológicas que participan en la transmisión sináptica, lo que ha posibilitado recoger abundante información sobre los fenómenos neuroquímicos de la terminal nerviosa presináptica (Rodríguez y de Robertis, 1972; Bradford, 1975; Jones, 1976; Whittaker, 1984; McMahan y Nicholls, 1991; Lentzner *et al.*, 1992; Fontana y Blaustein, 1993; Thomas *et al.*, 1994).



**Figura I.5.1.** Modos de formación de los sinaptosomas. Desde A a B y a C se producen estructuras desgarradas. Desde A a X se producen estructuras fenestradas cuyas membranas se volverán a cerrar posteriormente (tomado de Bradford, 1988).

A finales de 1950 y principios de 1960, por primera vez, se identifican morfológicamente los sinaptosomas como derivados de terminales nerviosas que sobrevivían intactos (Gray y Whittaker, 1962). Desde entonces se sabe que están constituidos por vesículas citoplasmáticas cerradas con un diámetro de 1-2  $\mu\text{m}$  que contienen todas las microestructuras y orgánulos celulares visibles en las sinapsis intactas *in situ*. Cabe destacar que estas estructuras apenas sufren daño durante su preparación (Bradford, 1988).

Cuando los sinaptosomas se incuban a 37°C forman estructuras redondeadas capaces de llevar a cabo, de forma organizada e integrada, algunas de las principales actividades de los terminales nerviosos de los que derivan (De Belleruche y Bradford, 1973; Bradford, 1975).

Las mitocondrias contenidas en los sinaptosomas son habitualmente estructuras alargadas, similares a un cordel, y se aprecian fácilmente en las imágenes

de microscopía electrónica de sinaptosomas teñidos negativamente (Whittaker *et al.*, 1964). Al utilizar una tinción positiva se pueden ver diversos perfiles transversales de lo que sería una mitocondria alargada. Además la tinción negativa revela el retículo endoplasmático tubular del sinaptosoma, que en el caso de cortes teñidos positivamente aparece como una matriz granular o series de vacuolas (Jones y Bradford, 1971; Csillag y Hajos, 1980). Existe una pequeña proporción de sinaptosomas que lleva unido un saco postsináptico formado de la estructura postsináptica (dendrita, espina dendrítica o cuerpo celular) mediante arrancamiento (Csillag y Hajos, 1980). En sinaptosomas teñidos positivamente pueden verse con claridad las vesículas sinápticas (Bradford, 1988).

Las vesículas sinápticas se diferencian como estructuras huecas con una membrana delimitante. Las densidades pre y postsinápticas son visibles si el plano de sección pasa a través de la hendidura sináptica o engrosamiento sináptico. En algunas ocasiones los sinaptosomas incubados muestran grandes vacuolas que probablemente reflejan una actividad pinocítica considerable (Jones y Bradford, 1971).

## **5.2. PROPIEDADES METABÓLICAS DE LOS SINAPTOSOMAS.**

Los sinaptosomas respiran activamente al incubarse en un medio de composición iónica similar a la del plasma o líquido cefalorraquídeo, más rico en iones  $\text{Na}^+$  que  $\text{K}^+$  y con un suplemento de glucosa (5-10mM). La respiración tiene lugar a gran velocidad y está acoplada a la formación de ATP y fosfocreatina, con elevados cocientes Fósforo:Oxígeno, y se mantiene a una velocidad constante durante varias horas (Bradford, 1969; 1975; Rodríguez, 1972; Verity, 1972; Whittaker, 1984). Este eficiente metabolismo energético significa que todos los componentes de la secuencia glicolítica están presentes, bien controlados y totalmente unidos a la actividad del ciclo de Krebs y a la fosforilación oxidativa. También demuestra que los sinaptosomas son fracciones subcelulares capaces de mantener su viabilidad durante largos periodos, y que al contrario de como se pensó al principio de su utilización, no se deterioran con rapidez si se mantienen a 37°C (Whittaker, 1969).

Debido a que los preparados de sinaptosomas son capaces de extraer  $\text{Na}^+$  y acumular  $\text{K}^+$  contra gradiente de concentración (Bradford, 1969; 1975; Csillag y Hajos, 1980). Una gran proporción del ATP y la fosfocreatina generada en el metabolismo de la glucosa y de otros sustratos endógenos serían utilizados probablemente para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas de los sinaptosomas. De hecho, existe una gran actividad  $\text{ATPase Na}^+/\text{K}^+$  en las preparaciones sinaptosómicas (Hosie, 1965; Bradford *et al.*, 1969; Diamond y Fishman, 1973; Marchbanks y Campbell, 1976). El adenosin-difosfato (ADP) es el

---

factor limitante de la fosforilación oxidativa al actuar como marcapasos respiratorio de los sinaptosomas, tal como ocurre en el SNC intacto (Bradford, 1988).

### **5.3. POTENCIALES DE MEMBRANA DE LOS SINAPTOSOMAS.**

En la actualidad se admite que los sinaptosomas son estructuras cerradas cuyo potencial de membrana es similar al de la terminal presináptica de la neurona intacta. Esta idea se basa en diversas observaciones; Así, el 80% de los sinaptosomas son impermeables a sustancias marcadoras extracelulares de gran tamaño, esto indica la presencia de membranas plasmáticas intactas (Jones y Bradford, 1971; Fried y Blaustein, 1978); La capacidad que tienen los sinaptosomas para dilatarse y redondearse durante la incubación y su tendencia a contraerse y expandirse en medios de diferentes isotonicidades es también una prueba directa de la continuidad de su membrana externa (Keen y White, 1970; Jones y Bradford, 1971; Fried y Blaustein, 1978); La salida activa de  $\text{Na}^+$  y el acúmulo de  $\text{K}^+$  reflejado en su composición iónica tras la incubación con glucosa también está de acuerdo con el concepto de estructura cerrada, al igual que sucede con su capacidad para retener los aminoácidos solubles libres que generan con muchos cofactores y enzimas solubles (Bradford, 1969; 1975; 1988; Csillag y Hajos, 1980).

De este modo, dos de los principales requerimientos para la generación de un potencial de membrana, o sea una membrana intacta y una bomba de sodio activa, parecen estar presentes en los sinaptosomas incubados (Blaustein, 1975; Blaustein y Goldring, 1975).

Cuando los sinaptosomas son tratados con agentes causantes de desplazamiento de los potenciales de membrana neuronal, se induce una serie de respuestas bioquímicas características de la despolarización de membrana. Tres de estos agentes son: el estímulo eléctrico, elevadas concentraciones de potasio y alcaloides del tipo de la veratridina, que producen un incremento de las proporciones respiratorias y glucolíticas que se acompañan de entrada de  $\text{Na}^+$ , salida de  $\text{K}^+$  y liberación de neurotransmisores dependientes de calcio (Bradford, 1970; 1988). En gran medida los sinaptosomas conservan, por tanto, las propiedades eléctricas de la membrana neuronal (Bradford, 1988).

### **5.4. PROPIEDADES DE LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR.**

Los preparados de sinaptosomas tratados con agentes despolarizantes muestran una respuesta metabólica acompañada de liberación de neurotransmisores. Puesto que estos preparados sinaptosómicos, de cualquier región cerebral, contienen

terminales nerviosas de diversas neuronas que utilizan diferentes neurotransmisores, se liberará un amplio rango de transmisores (McMahon y Nicholls, 1991).

Los fenómenos que acompañan a la liberación de neurotransmisores, por parte de los sinaptosomas, son similares a los que tienen lugar en los terminales nerviosos *in situ* al responder a la invasión despolarizante de un potencial de acción. Junto con las respuestas metabólicas descritas, existen fenómenos clave tales como la entrada de calcio, la disminución del número de vesículas sinápticas y la resíntesis de neurotransmisores para restaurar los depósitos intercelulares tras su liberación al medio de incubación (De Belleruche y Bradford, 1972; Fried y Blaustein, 1976; 1978).

### 5.5. SINAPTOSOMAS Y CALCIO.

Al igual que las neuronas, los sinaptosomas mantienen una concentración baja de calcio intracelular ( $0.4\mu\text{M}$ ) a pesar de la continua entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la actividad nerviosa. Este bajo nivel intracelular se consigue por el transporte de calcio a las mitocondrias y al retículo endoplasmático intrasinaptosómico, así como por la salida a través de la membrana plasmática sinaptosómica. Este proceso de salida utiliza el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la ATPasa calcio-dependiente (Schellenberg *et al.*, 1983).

El acúmulo de calcio en las mitocondrias y retículo endoplasmático de los sinaptosomas explica su eliminación a partir del citosol; otros orgánulos, como las vesículas sinápticas, son relativamente inactivos a este efecto (Carvalho, 1983). Aunque los orgánulos no mitocondriales muestran alta afinidad para el calcio, con una captación semisaturada de aproximadamente  $0.35\mu\text{M}$  de calcio, pueden almacenar solamente cantidades relativamente pequeñas de calcio. En contraste, las mitocondrias que poseen una afinidad más baja con respecto al calcio (la captación es semisaturada a  $10\text{-}100\mu\text{M}$  de calcio) poseen una capacidad de almacenamiento mayor que los orgánulos no mitocondriales (Bradford, 1988).

Se ha estudiado la distribución del calcio que entra en los sinaptosomas tras la despolarización, y a pesar de la mayor capacidad de almacenamiento de calcio de las mitocondrias, aproximadamente el 50% del calcio que entra en los terminales nerviosos se almacena en depósitos no mitocondriales y sólo un 20% aparece en mitocondrias. Esto sugiere que en el cerebro intacto, el transporte a orgánulos no mitocondriales (fundamentalmente retículo endoplasmático) es de importancia crítica para el amortiguamiento de la concentración de calcio en el citoplasma del terminal nervioso en plazos de tiempo muy cortos (Blaustein *et al.*, 1980; Lentzner *et al.*, 1992; Tareilus y Breer, 1992).



**II.**

**HIPÓTESIS Y  
PLANTEAMIENTO.**



El alcohol etílico es la sustancia psicoactiva más utilizada en el mundo después de la cafeína. Su consumo excesivo o crónico, además de provocar un efecto depresor sobre diversos centros nerviosos inhibidores, está asociado a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios en el SNC. En este sentido, parece ser que los procesos neurodegenerativos que ocurren en el SNC están causados por varios mecanismos. Por un lado, pueden ocurrir deficiencias energéticas, a las que el SNC es especialmente vulnerable debido al alto metabolismo que desarrollan las neuronas y a su baja capacidad de almacenamiento de sustratos ricos en energía. Por tanto, fallos en la capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía o la simple necesidad de responder rápidamente a un mayor requerimiento de la misma, pueden disminuir la viabilidad neuronal. También, la hiperactividad de los neurotransmisores ácidos (Glu y Asp) conduce a que estas sustancias actúen como potentes toxinas endógenas, originando degeneración y muerte neuronal. Por último, la participación de los radicales libres originados como consecuencia del metabolismo (estrés oxidativo) es causa de gran importancia en los procesos neurodegenerativos, ya que provocan entre otros fenómenos, la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, alterando su estructura y provocando la muerte celular. Este conjunto de mecanismos no son excluyentes, sino que parecen compartir un proceso último, responsable del desarrollo de los procesos de degeneración neuronal, y que es el aumento excesivo de los niveles de calcio libre citosólico.

En cualquier caso, y aparte de estos efectos degenerativos, la diversidad de efectos bioquímicos y del comportamiento inducidos por el alcohol, sugieren que este actúa a distintos niveles del SNC. Aunque muchos estudios se han centrado en la capacidad del alcohol para modificar de forma inespecífica la fluidez de las membranas y alterar la función de las proteínas que se insertan en ellas, existe un interés emergente en conocer el papel de las rutas neuroquímicas y los sistemas neurotransmisores/neuromoduladores implicados en esta adicción, ya que no se conoce bien como actúa el alcohol a nivel del SNC, ni la naturaleza exacta del alcoholismo como proceso patológico.

Las AP son enzimas que hidrolizan uniones peptídicas cercanas al terminal amino de péptidos y polipéptidos y son consideradas como una de las principales vías

---

de inactivación de los neuropéptidos y de la formación de péptidos activos mediante la hidrólisis de sus precursores. Las variaciones en las distintas actividades AP son importantes porque reflejan el estado funcional de sus correspondientes sustratos, pertenecientes a diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores.

Así, la AlaAP y LeuAP junto con la TyrAP, pueden hidrolizar bradisininas, encefalinas y pueden tener incluso actividad angiotensinasa. La ArgAP hidroliza específicamente residuos básicos N-terminales de péptidos y derivados arilamidas, y gracias a su actividad exopeptidasa, se ha implicado en el metabolismo de la Met-enkefalina y la Ang III. Su actividad endopeptidasa está implicada en el metabolismo de la neurotensina. La CysAP hidroliza oxitocina y vasopresina. La AspAP y GluAP tienen como sustratos fisiológicos la Ang II, molécula encargada del mantenimiento de la presión sanguínea a nivel cerebral, gracias a la existencia de SRA cerebrales que regulan la presión sanguínea cerebral a través del balance de líquidos y electrolitos. Puesto que las actividades AspAP y GluAP tienen una rápida acción sobre los residuos de Asp y Glu N-terminal de los péptidos, su función puede, además, modificar el conjunto de aminoácidos libres a través de la liberación de estos aminoácidos N-terminales, y tanto el Glu como el Asp, son, como decíamos, particularmente activos en el SNC. Por tanto, cambios en las actividades AspAP y/o GluAP pueden contribuir además, a que se modifique de alguna manera el recambio de los aminoácidos excitadores, cuya hiperactividad llevaría a que actuaran como potentes toxinas endógenas inductoras de degeneración y muerte neuronal. Finalmente, la pGluAP es una omega-peptidasa involucrada en la regulación de distintos sustratos endógenos, en especial, la TRH.

En base a estos datos, en la presente Tesis Doctoral se ha planteado estudiar que capacidad tiene el alcohol etílico de producir neurodegeneración, analizando su capacidad de modificar los niveles normales de obtención de energía a nivel mitocondrial, o de provocar estrés oxidativo, analizando la producción de radicales libres generados durante el metabolismo normal, el grado de peroxidación lipídica y la formación de grupos carbonilo por oxidación de las proteínas celulares. Además, se plantea el estudio de la capacidad del alcohol etílico de modificar la actividad de los enzimas proteolíticos del tipo de las AP, encargadas de la inactivación de diversos neuropéptidos, como los péptidos opiáceos, oxitocina, vasopresina, TRH o los péptidos del SRA cerebral, y valorar la participación de estos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores en los efectos inducidos por el alcohol. De este modo se puede comprobar además la existencia o no de correlaciones entre las actividades AP y los procesos degenerativos inducidos por el etanol, para valorar el papel de estos enzimas en los procesos neurodegenerativos inducidos por alcohol etílico. Por último, se pretende analizar el papel que tiene el ión calcio en el desarrollo de estos procesos.

Para ello, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

- Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
- Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre la producción de radicales libres en sinaptosomas, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
- Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre el nivel de peroxidación lipídica en sinaptosomas, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
- Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre el nivel de oxidación de proteínas de sinaptosomas en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.
- Estudio del efecto del etanol, bien añadido *in vitro*, bien administrado *in vivo*, sobre la actividad específica de un amplio espectro de actividades AP (AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP, pGluAP, LeuAP y TyrAP) en sinaptosomas y en su medio de incubación, en condiciones basales o tras despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , en un medio de incubación con calcio o libre de calcio.



**III.**

**MATERIAL Y  
MÉTODOS.**



## 1. ANIMALES.

En los experimentos realizados en este estudio se han utilizado 296 ratones macho de la variedad Balb/C, con un peso medio de  $27.5 \pm 5.5$  g.

Los animales han sido proporcionados por el Estabulario de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén y estuvieron acondicionados con un fotoperiodo día/noche de 12 horas, bajo condiciones constantes de temperatura (20-25°C).

### 1.1. ESTUDIO *IN VITRO*.

En el estudio *in vitro* los animales disponen de comida y bebida *ad libitum*. Tras obtener la fracción sinaptosomal (ver más adelante), se han llevado a cabo los siguientes protocolos experimentales:

- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación con calcio (condiciones basales), en presencia de etanol 25 mM, 50 mM y 100 mM.
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación libre de calcio (condiciones basales), en presencia de etanol 25 mM, 50 mM y 100 mM.
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación con calcio añadido de  $K^+$  25 mM (condiciones despolarizantes).
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación libre de calcio añadido de  $K^+$  25 mM (condiciones despolarizantes).
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación con calcio añadido de  $K^+$  25 mM en presencia de etanol 25 mM, 50 mM y 100 mM.
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación libre de calcio añadido de  $K^+$  25 mM en presencia de etanol 25 mM, 50 mM y 100 mM.

Estas incubaciones se llevan a cabo en un baño termostatzado a 37°C durante 15 minutos. Tras este tiempo, los sinaptosomas se centrifugan en una microfuga (ALC 4214) a 14.000 rpm durante 3 minutos, para eliminar del medio de incubación el  $K^+$  25 mM y/o las distintas concentraciones de etanol utilizadas. Tras centrifugar,

los sinaptosomas se resuspenden de nuevo en el medio de incubación adecuado (con calcio o libre de calcio), que se mantuvo a 37°C. Los sinaptosomas así obtenidos se utilizan para determinar la actividad mitocondrial, la producción de radicales libres, el nivel de peroxidación lipídica, el nivel de oxidación de proteínas y las distintas actividades AP. También se determinan las actividades AP en los diferentes medios de incubación en los que se mantuvieron los sinaptosomas durante los protocolos experimentales descritos anteriormente.

### 1.2. ESTUDIO *IN VIVO*.

En el caso del estudio *in vivo*, los animales se han dividido en dos grupos. A uno de ellos se les ha administrado etanol como dieta líquida preparada añadiendo al agua de bebida etanol hasta un 15%, tras cuatro días de adaptación progresiva (3, 6, 9 y 12% de etanol). Este porcentaje, del 15%, se mantuvo durante 30 días. Los animales disponen de bebida y comida *ad libitum*.

Tras la obtención de sinaptosomas de los animales controles y de los tratados con etanol, se llevaron a cabo los siguientes protocolos experimentales:

- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación con calcio (condiciones basales) y con calcio añadido de K<sup>+</sup> 25 mM (condiciones despolarizantes).
- Incubación de los sinaptosomas en un medio de incubación libre de calcio (condiciones basales) y libre de calcio añadido de K<sup>+</sup> 25 mM (condiciones despolarizantes).

Estas incubaciones se llevan a cabo en un baño termostatzado a 37°C durante 15 minutos. Tras este tiempo, los sinaptosomas se centrifugan en microfuga a 14.000 rpm durante 3 minutos, para eliminar del medio de incubación el K<sup>+</sup> 25 mM. Tras centrifugar, los sinaptosomas se resuspenden de nuevo en el medio de incubación adecuado (con calcio o libre de calcio), que se mantuvo a 37°C. Los sinaptosomas así obtenidos se utilizan para determinar la actividad mitocondrial, la producción de radicales libres, el nivel de peroxidación lipídica, el nivel de oxidación de proteínas y las distintas actividades AP. También se determinan las actividades AP en los diferentes medios de incubación en los que se mantuvieron los sinaptosomas durante los protocolos experimentales descritos anteriormente.

## 2. OBTENCIÓN DE SINAPTOSOMAS.

La fracción de sinaptosomas utilizada en los diferentes experimentos realizados en el presente estudio se ha obtenido de acuerdo al siguiente protocolo (Martínez-Martos *et al.*, 2000):

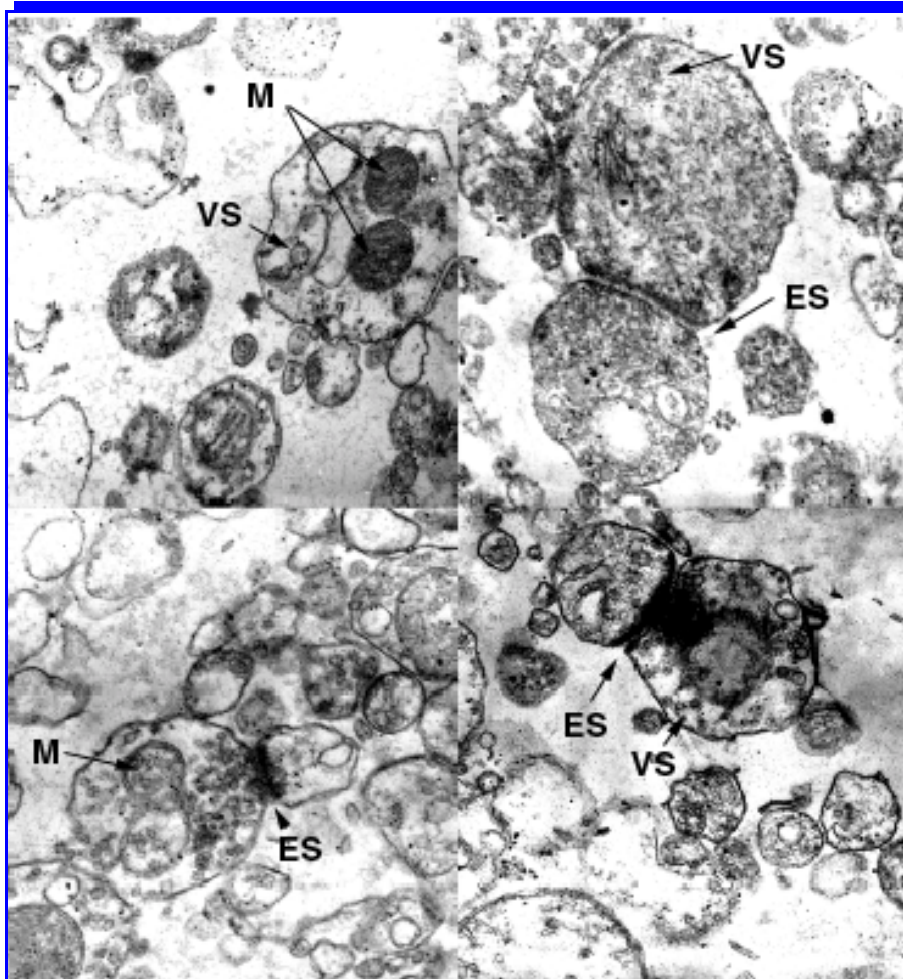
Tras la muerte del animal por decapitación, se extrae el cerebro. Con ayuda de un bisturí, se secciona la parte correspondiente a la corteza cerebral del polo frontal. El tejido obtenido, que se mantiene a 4°C durante todo el proceso, se pesa (balanza electrónica Scaltec SBC 21) y se homogeniza en sacarosa 0.32 M mantenida a 4°C (relación peso de tejido-volumen de sacarosa: 30 mg/ml), utilizando un homogenizador de émbolo de teflón (Heidolph RZR-1), mediante 10 golpes de émbolo.

El homogenado así obtenido se centrifuga a 2.000 g durante 12 minutos (centrífuga de mesa con rotor angular P-Selecta) para eliminar de la muestra los restos de tejido y sangre.

Tras centrifugar, se recoge el sobrenadante y se vuelve a centrifugar a 30.000 g durante 27 minutos a 4°C (ultracentrífuga Beckman L7-55). Se elimina el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1.5 ml de sacarosa 0.32 M. Este volumen se añade sobre un gradiente de densidad previamente preparado con 1.5 ml de sacarosa 1.4 M/1.5 ml de sacarosa 0.8 M. El gradiente así formado se centrifuga a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C.

Tras centrifugar, se elimina el sobrenadante y se recoge el precipitado que aparece en el centro del gradiente de densidad. El precipitado obtenido, correspondiente a la fracción sinaptosomal, se resuspende en un medio de incubación adecuado, dependiendo del protocolo experimental seguido, ajustando el volumen para obtener una concentración final de proteína en la muestra de 0.1 mg/ml.

Para verificar la calidad de la fracción de sinaptosomas obtenida, se ha llevado a cabo una preparación para microscopía electrónica mediante técnicas estándar (*figura III.2.1.*).



**Figura III.2.1.** Microfotografía de microscopio electrónico que muestra los sinaptosomas obtenidos de la corteza frontal. Obsérvese la presencia de vesículas sinápticas (VS), mitocondrias (M), engrosamientos sinápticos (ES). Fijación con tetróxido de osmio; tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo.

### 3. DETERMINACIONES.

#### 3.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SUERO.

En el estudio *in vivo*, a los animales a los que han tomado etanol como dieta líquida, se les ha determinado la cantidad de etanol en suero. El método de determinación de etanol utilizado corresponde a Sigma (procedimiento 332-UV), que a su vez es una modificación del método descrito por Bucher y Redetzki (1951), basado en que el enzima ADH cataliza la oxidación del etanol hacia acetaldehído con la reducción simultánea de NAD hacia NADH<sub>2</sub>. El incremento producido en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de etanol en la muestra, suero en este caso. Este método es capaz de medir mg de alcohol por dl de suero.

El procedimiento llevado a cabo es el siguiente: tras obtener la muestra de sangre del ratón, se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos. A cada vial, que contiene 1.8 μmoles de NADH, 150 unidades de ADH (levadura) y tampón salino, se le añade 3 ml de tampón glicina (0.5mol/litro) a pH 9. Tras agitarse suavemente, al blanco se le añade 0.01 ml de agua milli-Q y al resto 0.01 ml de suero. Se vuelve a agitar suavemente y tras 10 minutos a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 340 nm. La cantidad de etanol en suero viene expresada por la siguiente fórmula:

$$\text{Alcohol (mg/dl)} = \text{Abs}_{340} \cdot 223$$

El coeficiente 223 viene definido por los siguientes parámetros: volumen total de la reacción (3.01), peso molecular del etanol (46), conversión de ml a dl (100), coeficiente de absorción mM de NADH a 340 nm (6.22), volumen de muestra (0.01), volumen total de reacción (1) y conversión de ml a l (100).

$$223 = \frac{3.01 \cdot 46 \cdot 100}{6.22 \cdot 0.01 \cdot 1 \cdot 100}$$

### 3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.

La determinación de la actividad mitocondrial en sinaptosomas, se ha llevado a cabo utilizando la sal tetrazólica denominada bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT). Este compuesto es hidrolizado por el enzima mitocondrial succinato-dehidrogenasa, originando un compuesto azul oscuro que puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Mosmann, 1983), y que es un índice del comportamiento bioenergético de la fracción sinaptosomal utilizada (Martínez-Martos *et al.*, 2000).

El procedimiento seguido fue el siguiente: obtenidos los sinaptosomas se incuban posteriormente en los diferentes medios de incubación, en función del protocolo seguido (ver apartados 1 y 2), y tras la última centrifugación se resuspenden en medio de incubación con calcio o libre de calcio, según corresponda, que contiene MTT 1 mM. De estas muestras se ponen por triplicado 20  $\mu$ l en placas de 96 pocillos. Tras incubar durante 30 minutos a 37°C en baño termostatizado, se para la reacción añadiendo 100  $\mu$ l de isopropanol ácido. Se agita enérgicamente y finalmente se mide en un lector de microplacas (Whittaker 2001) a una longitud de onda de 550 nm con referencia a una longitud de onda de 620 nm. Los valores obtenidos se expresan en unidades de densidad óptica.

### 3.3. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.

La determinación de la producción de radicales libres se ha llevado a cabo mediante un método quimioluminiscente previamente descrito por Küçükkaya y colaboradores (1996), en el cual se utilizan los potenciadores de quimioluminiscencia 5-N-2,3-dihidro-1,4-oftalazinediona (Luminol) o nitrato de bis-N-metilacridina (Lucigenina), para aumentar la señal quimioluminiscente producida por la formación de radicales libres.

Para ello, tras la obtención de la fracción de sinaptosomas (ver apartado 2), el precipitado se resuspende en un medio de incubación con calcio o libre de calcio añadido de etanol 25, 50 o 100 mM,  $K^+$  25 mM o  $K^+$  25 mM más etanol 25, 50 o 100 mM, en función del protocolo seguido (ver apartados 1 y 2) y que contiene Luminol o Lucigenina 0.2 mM. Seguidamente, las muestras se miden en un luminómetro (Beckman LS 18101), utilizando un tiempo de muestreo de 0.1 minuto y un tiempo entre medidas sucesivas de 0.5 minutos. Los blancos de la prueba contienen únicamente el correspondiente medio de incubación. Los resultados obtenidos se expresan en cuentas por minuto (cpm).

### **3.4. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.**

La determinación del nivel de peroxidación lipídica se ha llevado a cabo analizando el contenido en sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), siguiendo el método de Haklar y colaboradores (1995), modificado por Küçükaya y colaboradores (1996).

Para ello, a 750  $\mu$ l de la suspensión de sinaptosomas obtenida de los diferentes protocolos experimentales (ver apartados 1 y 2), se le añade el mismo volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, mantenido a 4°C. Tras centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos en microfuga, se recoge el sobrenadante y se le añade el mismo volumen de ácido tiobarbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2--SH) (TBA) al 0.67%. La mezcla se hierve durante 15 minutos y tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se mide a 532 nm de longitud de onda. Como blanco se utiliza un volumen a partes iguales de TCA:TBA. Los resultados obtenidos se corresponden a equivalentes de malondialdehído (MDA) utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.5. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La determinación del nivel de oxidación de proteínas se ha llevado a cabo analizando el contenido en grupos carbonilos y dieno-conjugados aparecidos en las muestras, siguiendo el protocolo de Levine y colaboradores (1990), modificado por Küçükaya y colaboradores (1996).

Para ello, a 750  $\mu$ l de la suspensión de sinaptosomas obtenida tras los distintos protocolos experimentales (ver apartado 1 y 2) se le añaden 750  $\mu$ l de TCA al 20% mantenido a 4°C. Se centrifuga a 3500 rpm durante 8 minutos y se elimina el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspende en 500  $\mu$ l de 2,4-DNP 10 mM (2,4-dinitrofenilhidrazina) en HCl 2M. Esta solución se mantiene durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad, agitando cada 10-15 minutos. A continuación se añaden 200  $\mu$ l de TCA al 20% y se mantiene durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifuga a 14.000 rpm durante tres minutos y se desecha el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspende en 200  $\mu$ l de NaOH 1 M y se incuba a 37°C durante 15 minutos. Tras este tiempo, se centrifuga a 14.000 rpm en microfuga durante 5 minutos y se mide el sobrenadante a una longitud de onda de 360 nm. Los resultados obtenidos se corresponden a nm/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción molar de  $22 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.6. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.

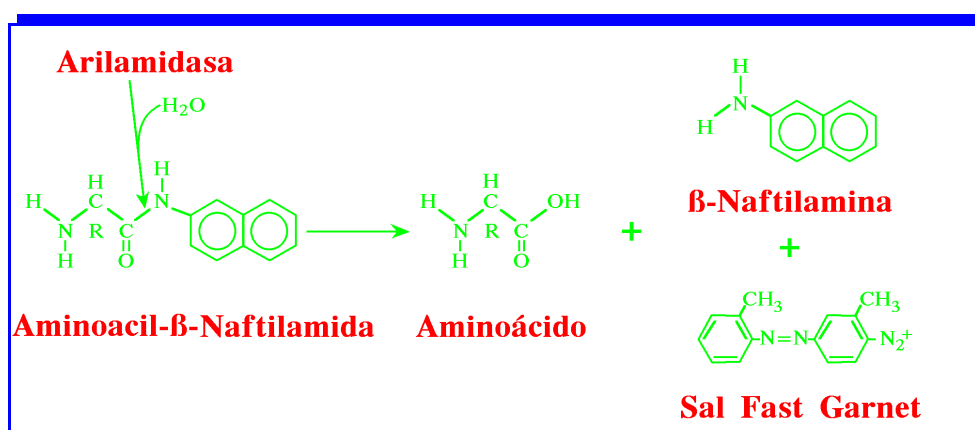
La actividad AP ha sido determinada tanto en sinaptosomas como en su correspondiente medio de incubación, en función de los diferentes protocolos seguidos (ver apartado 1), frente a los sustratos:

L-Ala-β-naftilamida (AlaNNap)	L-Arg-β-naftilamida (ArgNNap)
L-Cys-β-naftilamida (CysNNap)	L-Asp-β-naftilamida (AspNNap)
L-α-Glu-β-naftilamida (GluNNap)	L-pGlu-β-naftilamida (pGluNNap)
L-Leu-β-naftilamida (LeuNNap)	L-Tyr-β-naftilamida (TyrNNap)

Estos sustratos han sido preparados a concentración 100 μM en un medio de incubación con calcio o libre de calcio, según el protocolo experimental correspondiente.

La determinación de las distintas actividades AP se ha llevado a cabo siguiendo los métodos de Greenberg (1962), Schawe y McDonald (1977), Schnebli (1979) y McDonald y Barrett (1986) con algunas modificaciones:

En placas de 96 pocillos (Costar) se ponen 20 μl de muestra (suspensión de sinaptosomas o medio de incubación) y se añaden 50 μl de la solución de sustrato conteniendo AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap 100 μM. Tras incubar durante 30 minutos a 37°C en baño termostatzado, se paran las reacciones añadiendo a cada pocillo 50 μl de sal *Fast Garnet GBC* en tampón acetato 0.1 M pH 4.2. La β-naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se acopla a la sal originando un compuesto rojizo que puede ser determinado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm (*figura III.3.1.*).



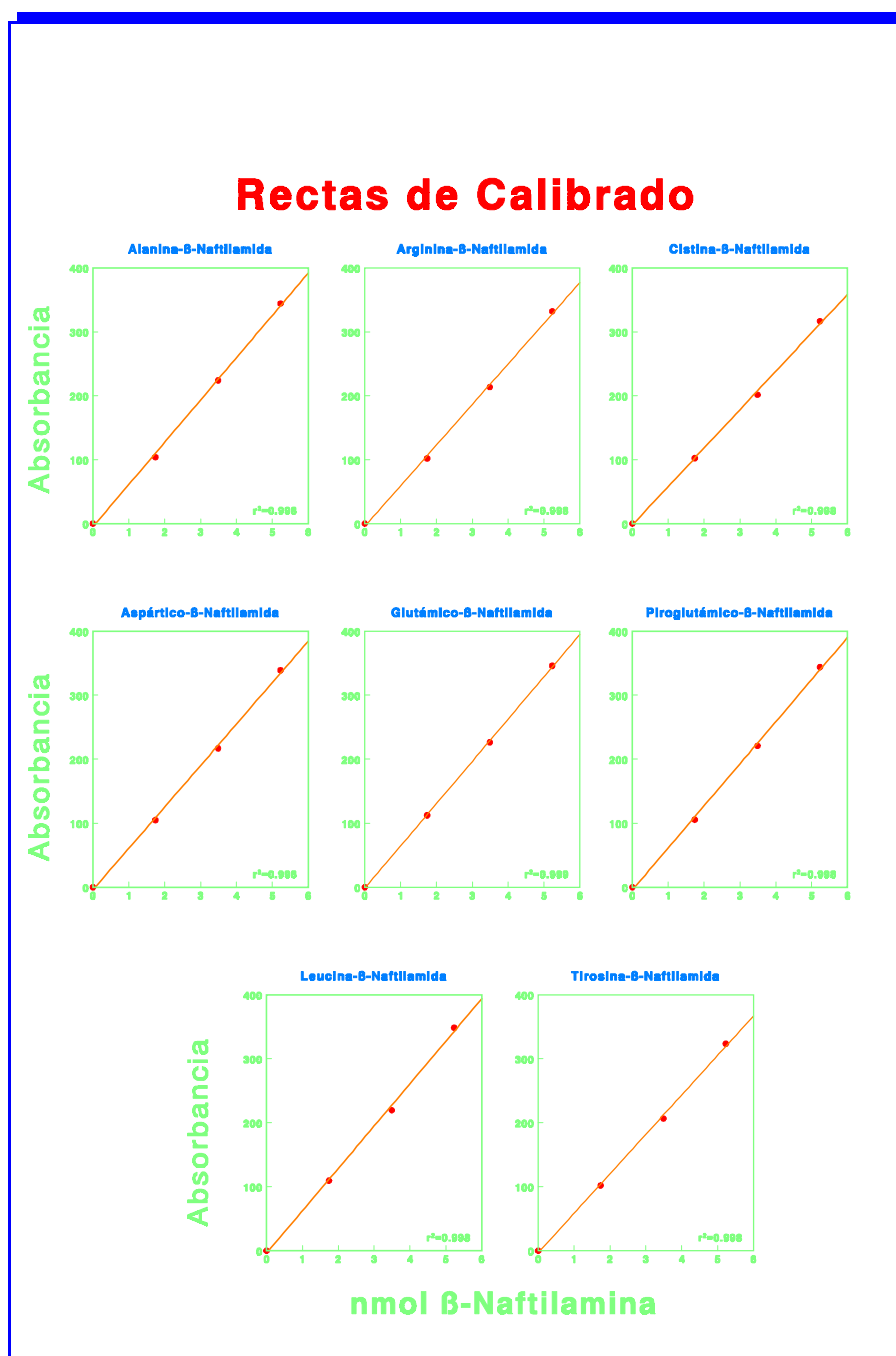
**Figura III.3.1.** Reacción desarrollada para la determinación de las actividades AP.

Las actividades enzimáticas específicas de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, GluAP, pGluAP, LeuAP y TyrAP se expresan en nmoles del correspondiente sustrato hidrolizado por minuto y por mg de proteína, utilizando una curva estándar de  $\beta$ -naftilamina.

### **3.6.1. Recta de Calibrado de $\beta$ -Naftilamina.**

La recta de calibrado de  $\beta$ -naftilamina se ha realizado disponiendo en los pocillos cantidades conocidas de este compuesto, a las que se añaden 50  $\mu$ l de las soluciones de sustrato conteniendo AlaNNap, ArgNNap, CysNNap, AspNNap, GluNNap, pGluNNap, LeuNNap o TyrNNap.

Tras incubar durante 30 minutos a 37°C, se añaden 50  $\mu$ l de sal *Fast Garnet GBC* en tampón acetato 0.1 M, pH 4.2. La  $\beta$ -naftilamina se acopla a la sal, pudiendo ser determinado espectrofotométricamente el compuesto originado a una longitud de onda de 550 nm. Cada muestra se mide por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras experimentales se extrapolan en estas rectas de calibrado para conocer la cantidad de  $\beta$ -naftilamina liberada como resultado de la correspondiente actividad enzimática (*figura III.3.2.*).



**Figura III.3.2.** Rectas de calibrado obtenidas para la  $\beta$ -naftilamina, en función del sustrato utilizado.

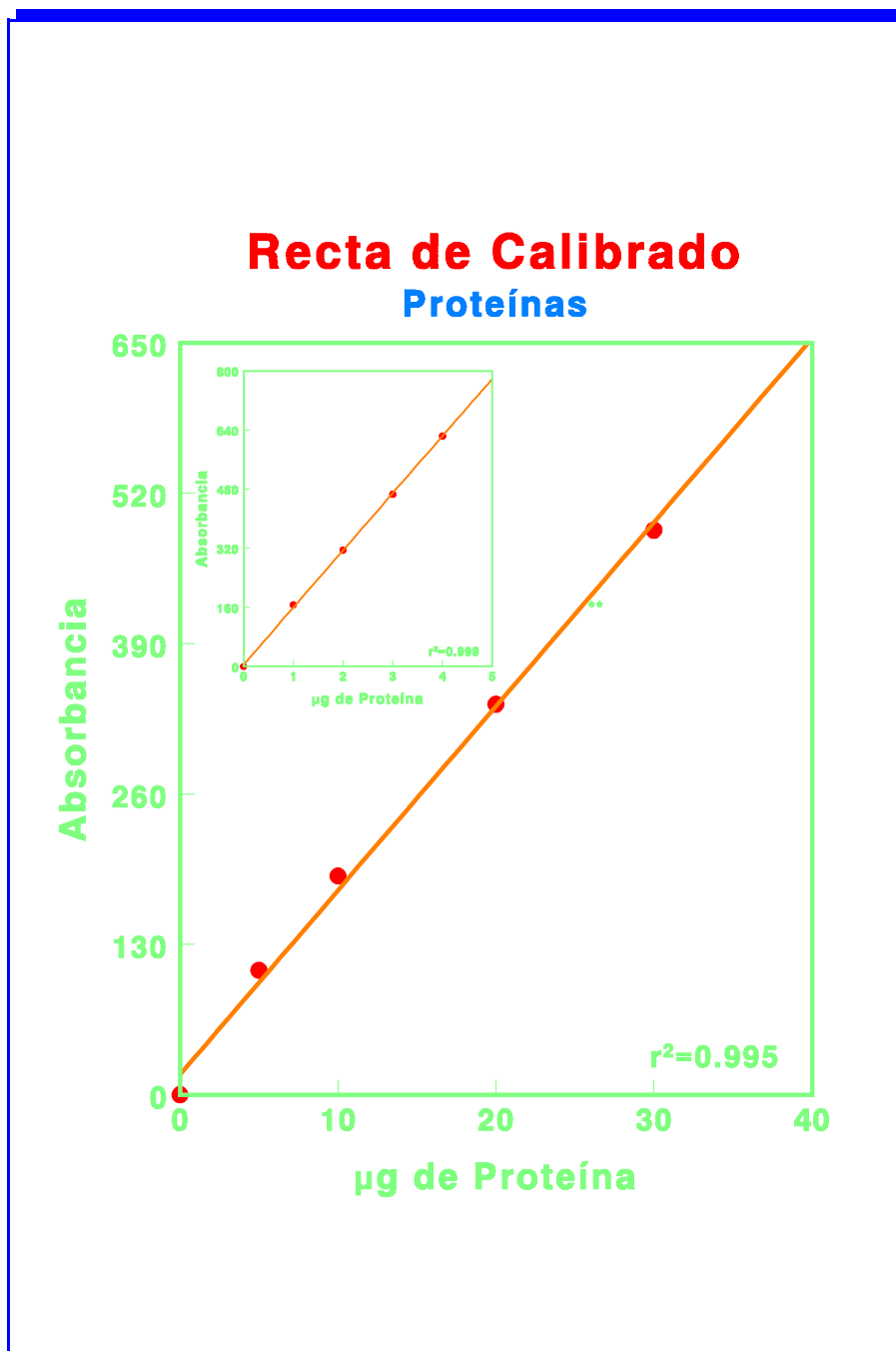
### **3.7. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.**

El método de determinación proteica utilizado en este estudio se corresponde con el descrito por Bradford en 1976, basado en la afinidad que tienen el colorante Coomassie azul brillante G por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm. Es precisamente este incremento de absorción el parámetro medido, puesto que resulta directamente proporcional a la concentración de proteínas, siempre que haya exceso de colorante. El método es capaz de medir  $\mu\text{g}$  de proteínas, por lo que se considera ideal para los experimentos realizados.

En el presente estudio se ha utilizado tanto el método original de Bradford, como un micrométodo modificado para la determinación de proteínas utilizando los pocillos de placas de microtiter. En el primer caso, a 25  $\mu\text{l}$  de muestra se añaden 2 ml de la solución de trabajo de Bradford (ver preparación de reactivos). Para el micrométodo, a 2  $\mu\text{l}$  de muestra se añaden 50  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 50  $\mu\text{l}$  de la solución de Bradford sin diluir. En ambos casos, el blanco de la prueba consiste en el correspondiente volumen de ésta solución en ausencia de muestra. Los valores de absorbancia se han leído espectrofotométricamente a 595 nm (espectrofotómetro digital CE 393, Cecil Instruments o lector de microplacas) y posteriormente se transforman en mg de proteínas por ml, utilizando una curva estándar (recta de calibrado).

#### **3.7.1. Recta de Calibrado de Albúmina.**

La recta de calibrado de albúmina se obtiene tras medir por los mismos procedimientos (método estándar o micrométodo) concentraciones crecientes de una solución de albúmina sérica bovina (1 mg/ml). Cada muestra se mide por triplicado y estos valores de absorbancia se extrapolan en la recta de calibrado para obtener el valor de proteína (*figura III.3.3.*).



**Figura III.3.3.** Rectas de calibrado obtenidas para la albúmina para los dos métodos descritos.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para estudiar el efecto producido por el etanol (administrado *in vitro* o *in vivo*) sobre los niveles basales o estimulados con  $K^+$  25 mM en presencia o ausencia de calcio en el medio, de los diferentes parámetros estudiados, se ha utilizado un análisis de la varianza de dos vías (ANOVA II), seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Valores de  $P < 0.05$  se consideran estadísticamente significativos.

Los datos han sido analizados mediante el paquete estadístico *Statgraphics versión 7.0*. Con este objetivo, los datos correspondientes a los parámetros estudiados se han organizado en archivos adecuados al tratamiento estadístico en una base de datos *Lotus* e importados desde *Statgraphics* para su procesamiento.



## 5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

### 5.1. SOLUCIONES DE ALCOHOL ETÍLICO.

Para preparar 200 ml de etanol al 15% en agua, se pesan 31.25 g de etanol 96% (Merck) y se afora hasta 200 ml con agua corriente. Para preparar el mismo volumen de soluciones al 3, 6, 9 y 12% se pesan respectivamente 6.25, 12.5, 18.75 y 25 g de etanol y se afora hasta 200 ml con agua corriente.

### 5.2. SOLUCIONES DE SACAROSA.

Para preparar 100 ml de soluciones de sacarosa 1.4 M, 0.8 M y 0.32 M, se pesan 47.92, 27.38 y 10.95 g de sacarosa respectivamente (Merck) y se afora hasta 100 ml con agua destilada.

### 5.3. MEDIO DE INCUBACIÓN.

Para preparar 100 ml de medio de incubación se pesan 670 mg de NaCl, 40.26 mg de KCl, 18.29 mg de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 14.04 mg de  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 26.46 mg de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 180 mg de glucosa y 210 mg de  $NaHCO_3$  y se afora hasta dicho volumen con agua destilada. El pH debe ser 7.2, y la composición iónica que se obtiene es de NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM,  $MgCl_2$  0.9 mM,  $NaH_2PO_4$  0.9 mM,  $CaCl_2$  1.8 mM, Glucosa 10 mM y  $NaHCO_3$  25 mM. Todos los compuestos químicos utilizados son de Merck.

### 5.4. MEDIO DE INCUBACIÓN LIBRE DE CALCIO.

Para preparar 100 ml se prepara de igual forma que el anterior, pero en lugar de utilizar  $CaCl_2$  se añaden 38.04 mg de EGTA (Fluka), obteniéndose una concentración final de 1 mM.

**5.5. SOLUCIÓN DE MTT.**

Se disuelven 10 mg de MTT (Sigma) en 10 ml de medio de incubación sin glucosa. La solución de trabajo se diluye diez veces con medio de incubación.

**5.6. SOLUCIÓN DE LUMINOL.**

Para preparar 10 ml de medio de incubación con luminol 0.2 mM, se pesan 0.35 mg de luminol (Sigma) y se afora hasta dicho volumen con medio de incubación.

**5.7. SOLUCIÓN DE LUCIGENINA.**

Para preparar 10 ml de medio de incubación con lucigenina 0.2 mM, se pesan 1.02 mg de lucigenina (Sigma) y se afora hasta dicho volumen con medio de incubación.

**5.8. SOLUCIÓN DE ISOPROPANOL ÁCIDO.**

Consiste en una mezcla de HCl (Merck)/Isopropanol (Merck) 1/250 volumen/volumen.

**5.9. SOLUCIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.**

Para preparar 100 ml de esta disolución se pesan 20 g de TCA (Sigma) y se afora hasta 100 ml con agua destilada.

**5.10. SOLUCIÓN DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.**

Se pesan 0.67 g de TBA (Sigma) y se llevan hasta un volumen de 100 ml con agua destilada.

**5.11. SOLUCIÓN DE 2,4-DINITROFENILHIDRAZINA.**

Se pesan 99.65 g de 2,4-DNP (Sigma) y se afora hasta 50 ml con agua destilada.

**5.12. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS.**

Se pesan 0.214 mg de AlaNNap, 0.335 mg de ArgNNap, 0.563 mg de CysNNap, 0.258 mg de AspNNap, 0.272 mg de GluNNap, 0.254 mg de pGluNNap, 0.256 mg de LeuNNap y 0.306 mg de TyrNNap (Sigma) y se disuelven en 10 ml de

medio de incubación respectivamente. La solución de Asp- $\beta$ -naftilamida lleva además 3.94 mg de  $MnCl_2$  (Merck).

#### **5.13. TAMPÓN ACETATO.**

Solución A: 11.55 ml de ácido acético (Merck) (0.2 M) se llevan hasta 1000 ml con agua destilada.

Solución B: 16.4 g de acetato sódico (Merck) (0.2 M) se llevan hasta 1000 ml con agua destilada.

Para preparar un litro de tampón acetato 0.1 M a pH 4.2 se mezclan 368 ml de la solución A con 132 ml de la solución B, completando el volumen de un litro con agua destilada.

#### **5.14. SOLUCIÓN DE SAL FAST GARNET GBC.**

Se pesan 100 mg de sal Fast Garnet GBC (Sigma) y se disuelven en 45 ml de tampón acetato, se filtra en papel y a continuación se añaden 5 ml de Tween 20 (polioxietileno-sorbitan monolaurato) (Sigma).

#### **5.15. SOLUCIÓN DE $\beta$ -NAFTILAMINA.**

Se pesa 1 mg de  $\beta$ -naftilamina (Sigma) y se disuelve en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO). Para preparar la solución de trabajo, se toman 50  $\mu$ l y se afora hasta 1 ml con medio de incubación.

#### **5.16. SOLUCIÓN DE BRADFORD.**

Para preparar 200 ml de la solución de Bradford, se disuelven 10 mg de Coomasie azul brillante (Sigma) en 50 ml de etanol al 96% (Merck). A continuación se añaden 100 ml de ácido ortofosfórico al 85% (Merck), completando el volumen con agua destilada. Se filtra en papel. La solución de trabajo se diluye cinco veces con agua destilada.

#### **5.17. SOLUCIÓN DE ALBÚMINA.**

Se pesan 100 mg de albúmina (Boheringer-Mannheim) y se disuelven en 100 ml de agua destilada. Se alicuota en 1 ml y se mantiene a  $-20^{\circ}C$  hasta su utilización.



**IV.**

**RESULTADOS.**



**1. ESTUDIO *IN VITRO*.**



---

**1.1. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.1.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol produce un aumento dosis-dependiente de esta actividad mitocondrial (*figura IV.1.1.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 39.03% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad del 53.57% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 58.95% ( $p < 0.01$ ) de la actividad mitocondrial. Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio (*figura IV.1.2.*), el etanol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, produce modificación significativa alguna de los niveles de actividad mitocondrial.

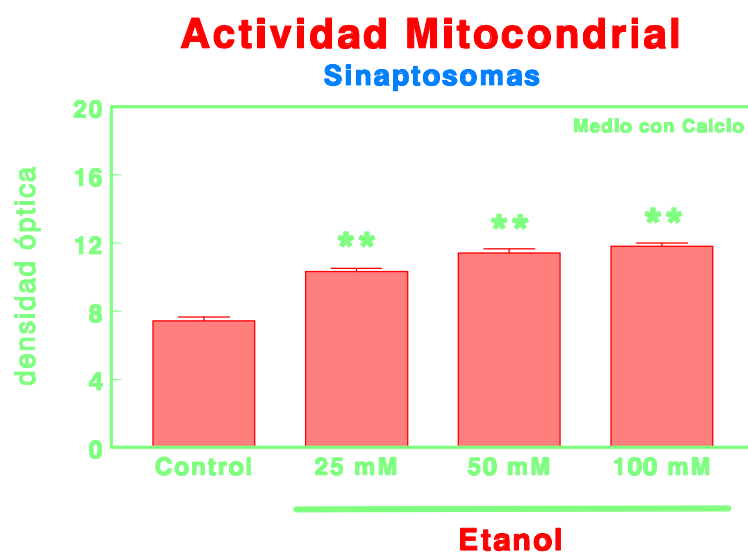
El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.2.*): En presencia de calcio en el medio, el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad en un 22.48% (*figura IV.1.2.*). Por el contrario en ausencia de calcio en el medio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica la actividad mitocondrial con respecto al control (*figura IV.1.3.*). La incubación simultánea, en un medio con calcio, de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad mitocondrial dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.2., figura IV.1.3.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM y 50 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad mitocondrial del 36.34% y 46.30% respectivamente, mientras que etanol 100 mM no produce modificación significativa alguna con respecto al valor control. En ausencia de calcio en el medio, la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad mitocondrial dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.2., figura IV.1.4.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM y 50 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad, mientras que etanol 100 mM produce una inhibición del 31.76% ( $p < 0.01$ ) de la actividad mitocondrial con respecto al control.

	<b>Sinaptosomas</b>	
	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	7.43±0.232	9.67±0.393
<b>EtOH 25 mM</b>	10.33±0.199	9.91±0.243
<b>EtOH 50 mM</b>	11.41±0.258	9.85±0.173
<b>EtOH 100 mM</b>	11.81±0.190	11.40±0.199

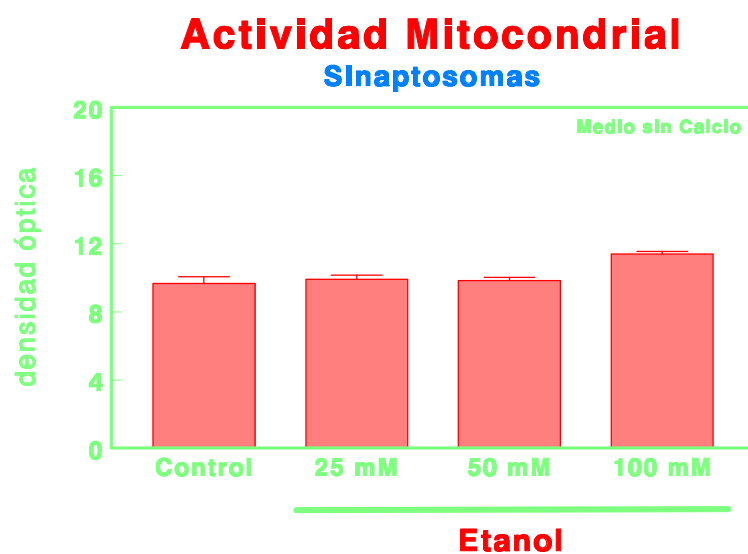
**Tabla IV.1.1.** Valores basales de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11).

	<b>Sinaptosomas</b>	
	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	7.43±0.232	9.67±0.393
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	9.10±0.190	11.24±0.272
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	10.13±0.208	10.49±0.374
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	10.87±0.170	10.71±0.160
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	7.43±0.759	6.66±0.888

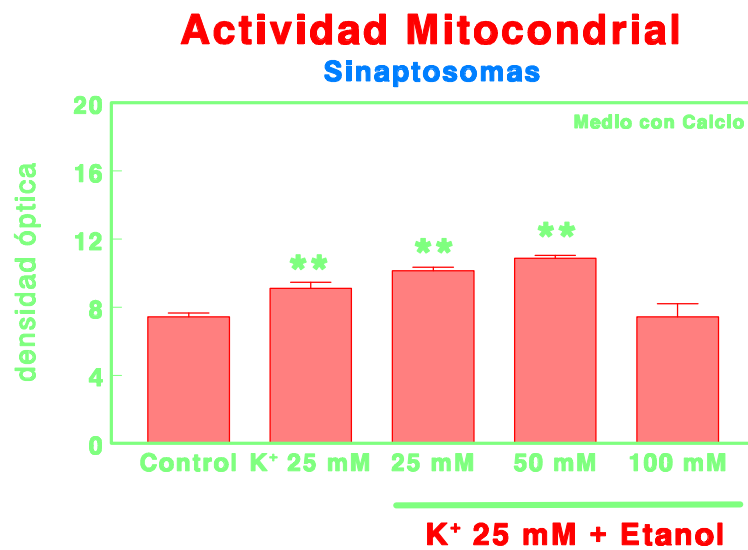
**Tabla IV.1.2.** Valores de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11).



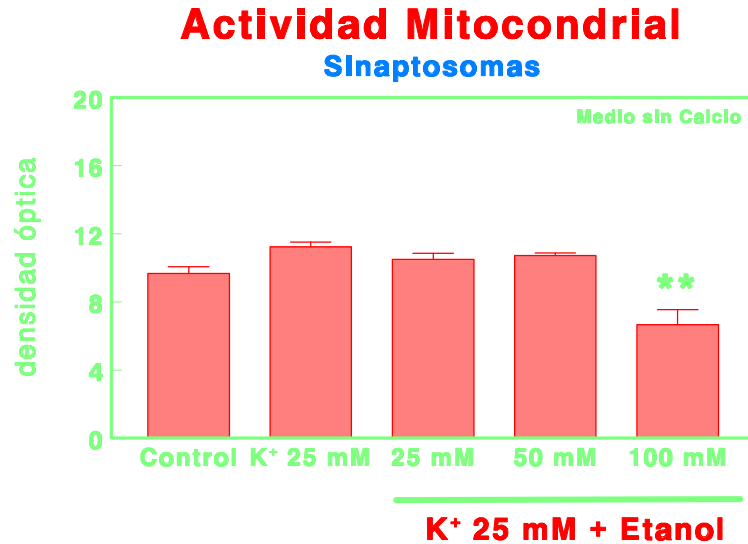
**Figura IV.1.1.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.2.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.3.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.4.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).

---

## 1.2. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.3.*): Utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia y en presencia de calcio en el medio, el etanol produce un comportamiento diferencial de la formación de radicales libres dependiendo de la concentración utilizada (*figura IV.1.5.*). Así, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM produce un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la producción de radicales libres del 19.37% y 19.04% respectivamente. Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio (*figura IV.1.6.*), el etanol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, provoca modificación significativa alguna de los niveles de formación de radicales libres.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres, tras la estimulación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.4.*): El estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no produce, ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación, modificación significativa alguna respecto a los valores control de la formación de radicales libres (*figuras IV.1.7. y IV.1.8.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol, a cualquiera de las concentraciones de etanol utilizadas, tampoco produce modificaciones significativas de la formación de radicales libres, ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación (*tabla IV.1.4., figuras IV.1.7. y IV.1.8.*).

Utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia los resultados son los siguientes (*tabla IV.1.3.*): La incubación de los sinaptosomas con etanol a cualquiera de las concentraciones utilizadas, no provoca modificación significativa alguna de los valores control de la producción de radicales libres, ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación (*figuras IV.1.9. y IV.1.10.*).

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres, tras la estimulación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón con  $K^+$  25 mM muestra que, ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación, se produce modificación significativa alguna con respecto a los valores control de la formación de radicales libres (*tabla IV.1.4., figuras IV.1.11. y IV.1.12.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol, a cualquiera de las concentraciones de etanol utilizadas, tampoco provoca modificaciones significativas en la formación de radicales libres ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación (*tabla IV.1.4., figuras IV.1.11. y IV.1.12.*).

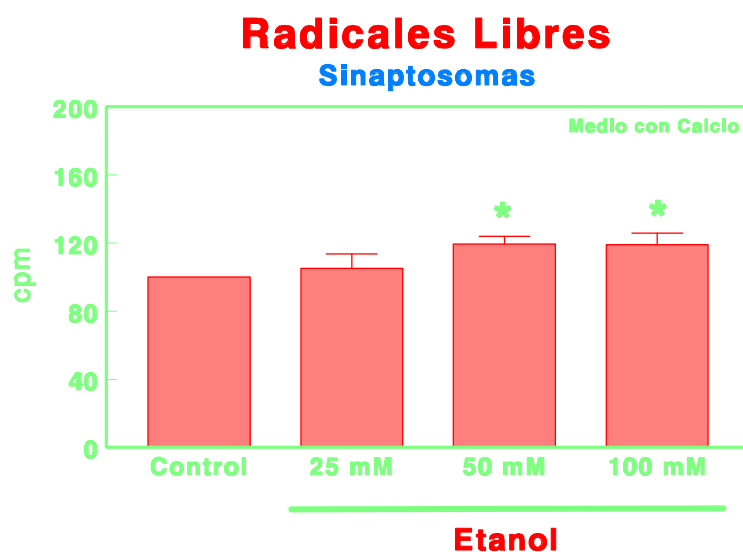
---

	<b>Sinaptosomas</b>			
	<b>Luminol</b>		<b>Lucigenina</b>	
	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin calcio</b>
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>EtOH 25 mM</b>	105.19±8.40	122.55±11.7	118.05±4.56	105.04±9.28
<b>EtOH 50 mM</b>	119.37±4.63	117.85±9.68	115.41±5.46	113.13±10.8
<b>EtOH 100 mM</b>	119.04±6.87	121.26±10.1	106.45±5.14	107.73±10.7

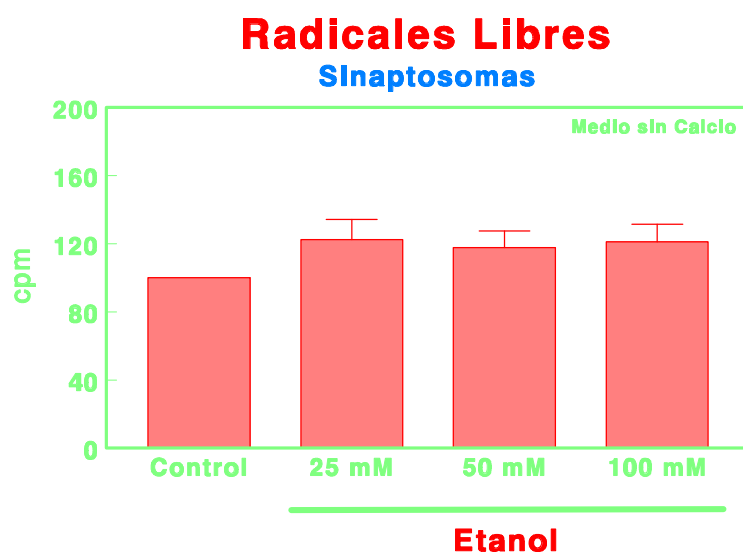
**Tabla IV.1.3.** Valores basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio y utilizando como potenciadores de la señal de quimioluminiscencia luminol y lucigenina. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).

	<b>Sinaptosomas</b>			
	<b>Luminol</b>		<b>Lucigenina</b>	
	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>	<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	95.39±6.65	104.46±11.6	116.94±4.66	104.30±11.6
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	109.1±4.64	124.77±10.5	101.98±6.55	106.98±9.18
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	113.96±5.82	124.37±11.8	90.84±6.87	102.30±9.60
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	115.45±5.32	123.41±10.7	100.86±7.22	116.24±9.03

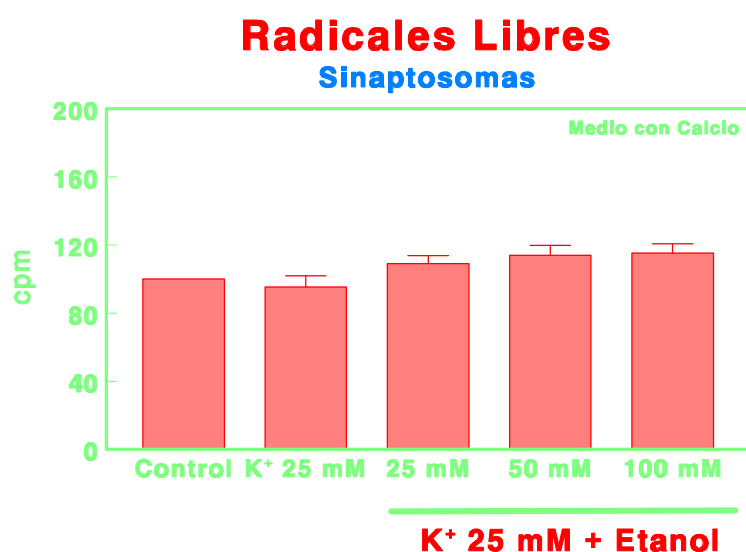
**Tabla IV.1.4.** Valores de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales, tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio y utilizando luminol y lucigenina como potenciadores de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



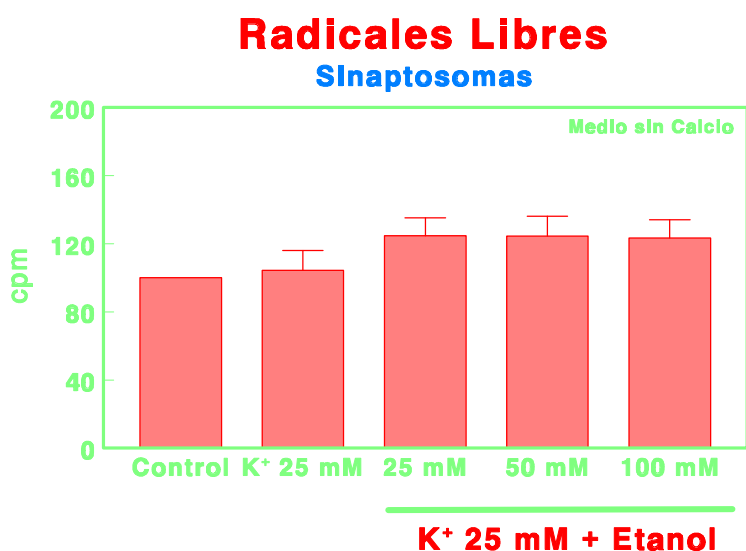
**Figura IV.1.5.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05).



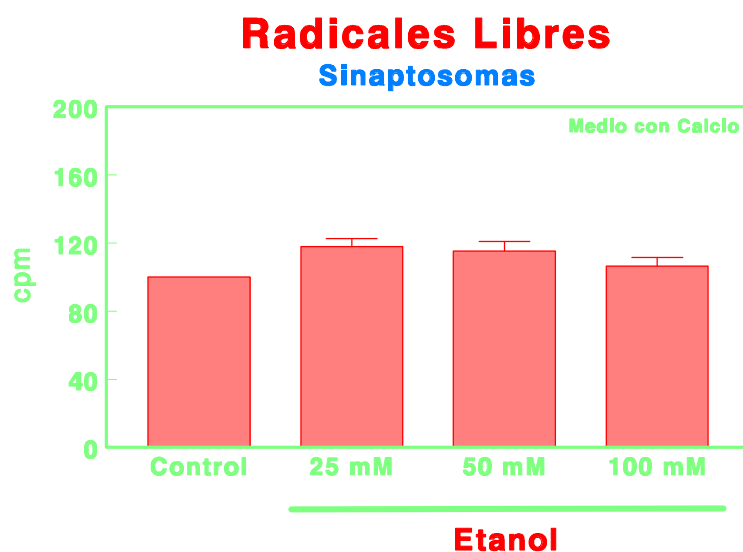
**Figura IV.1.6.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media $\pm$ SEM; n=11).



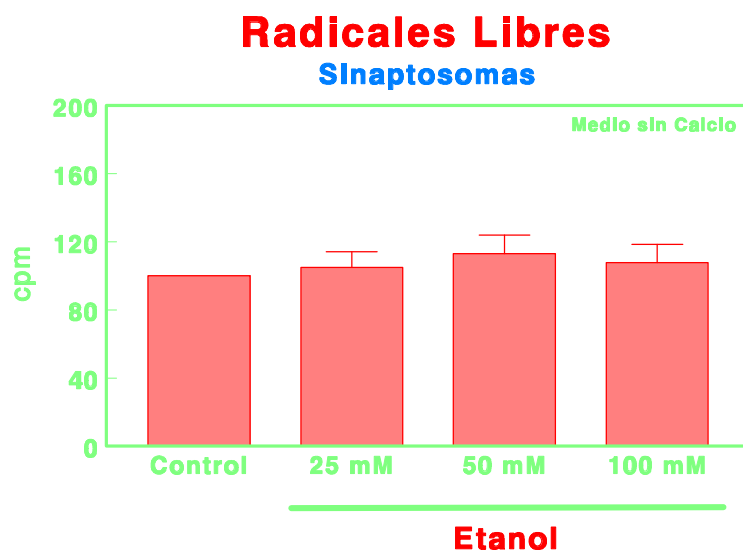
**Figura IV.1.7.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



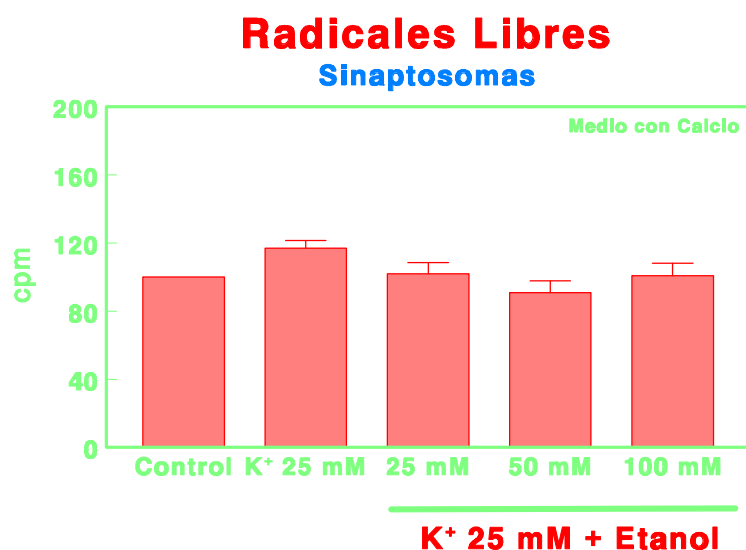
**Figura IV.1.8.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



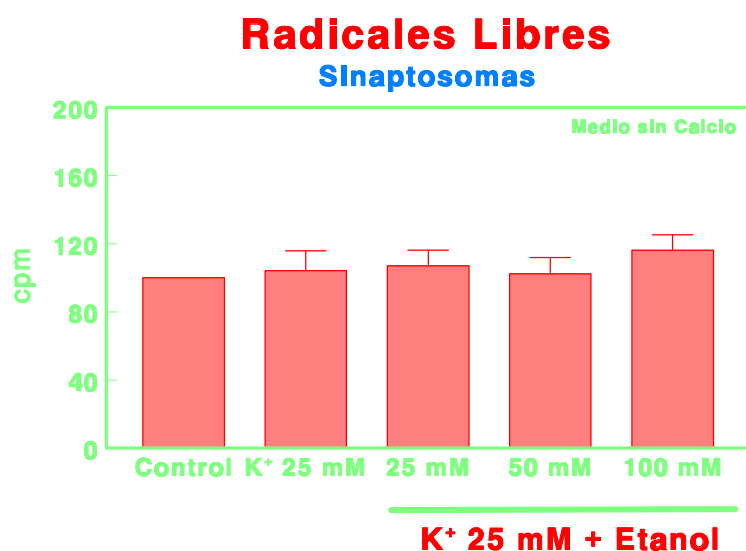
**Figura IV.1.9.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.10.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.11.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.12.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).

---

### 1.3. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL NIVEL DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre el nivel de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.5.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol produce un comportamiento diferencial dependiendo de la concentración utilizada (*figura IV.1.13.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 13.55% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM no produce modificación significativa alguna del nivel de peroxidación lipídica. En ausencia de calcio en el medio, también el etanol produce un comportamiento diferencial dependiendo de la concentración utilizada (*figura IV.1.14.*). Así, la concentración 25 mM y 50 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna respecto al valor control, mientras que etanol 100 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del 13.45% en los niveles de peroxidación lipídica.

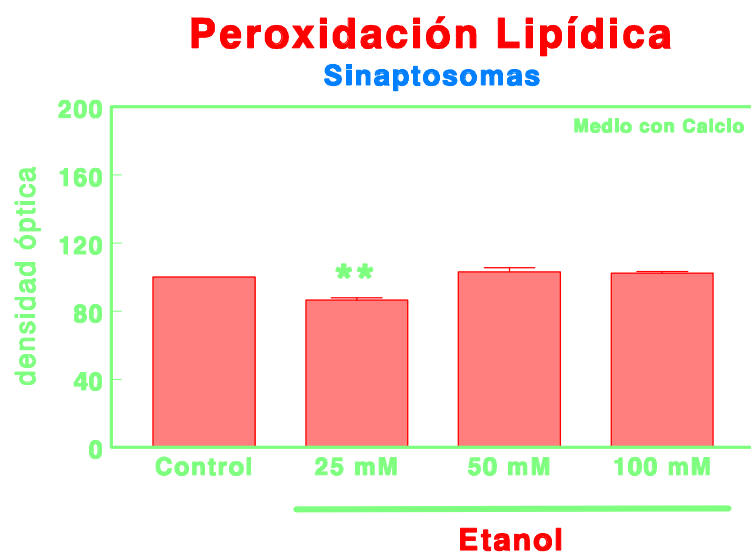
El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre los niveles de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.6.*): En presencia de calcio en el medio, el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente los niveles de peroxidación lipídica con respecto al control (*figura IV.1.15.*). Por el contrario en ausencia de calcio en el medio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) esta actividad en un 11.25% (*figura IV.1.16.*). La incubación simultánea, en un medio con calcio, de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol, a cualquiera de las concentraciones de etanol utilizadas, no produce modificación significativa alguna de los valores control de peroxidación lipídica (*tabla I6, figura IV.1.15.*). Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio, la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol produce un incremento de los niveles de peroxidación lipídica (*tabla IV.1.6., figura IV.1.16.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 47.44% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad del 44.26% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM produce un incremento del 24.42% ( $p < 0.01$ ) de los niveles de peroxidación lipídica.

	Sinaptosomas	
	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>EtOH 25 mM</b>	86.45±1.50	102.59±2.35
<b>EtOH 50 mM</b>	103.09±2.51	96.86±1.41
<b>EtOH 100 mM</b>	102.29±1.02	113.45±1.57

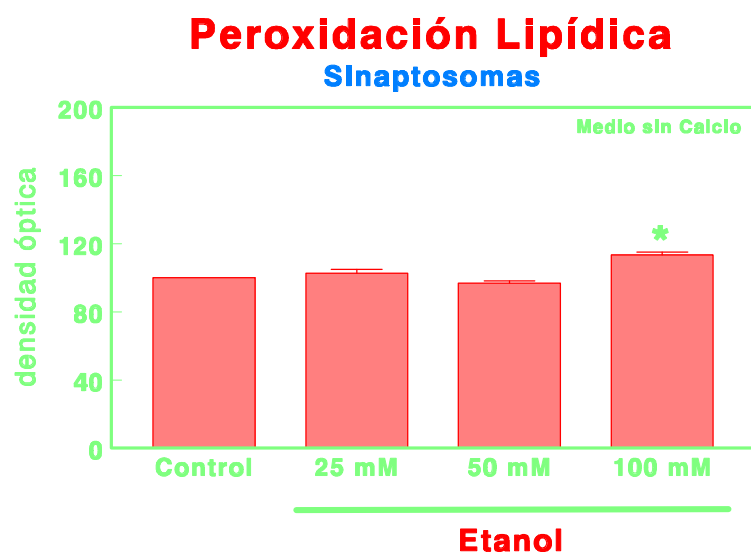
**Tabla IV.1.5.** Valores basales de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas	
	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	103.86±1.34	111.25±2.88
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	100.27±2.83	147.44±5.69
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	96.61±2.39	144.26±4.04
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	97.81±1.43	124.42±3.38

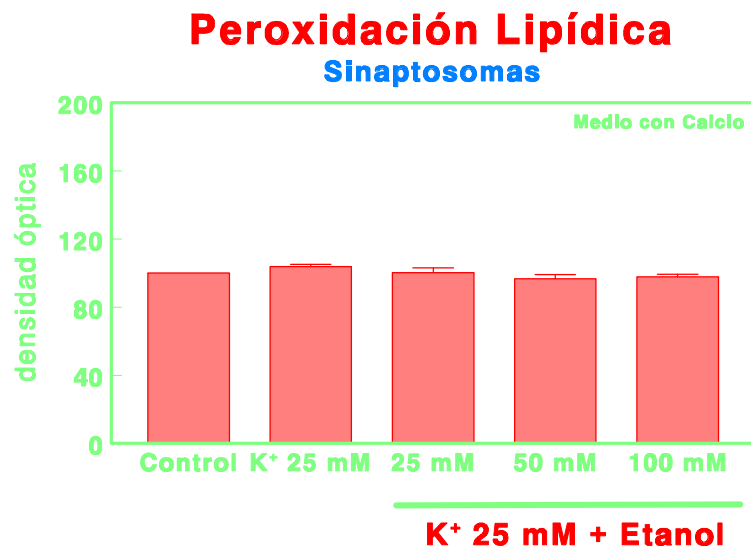
**Tabla IV.1.6.** Valores de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



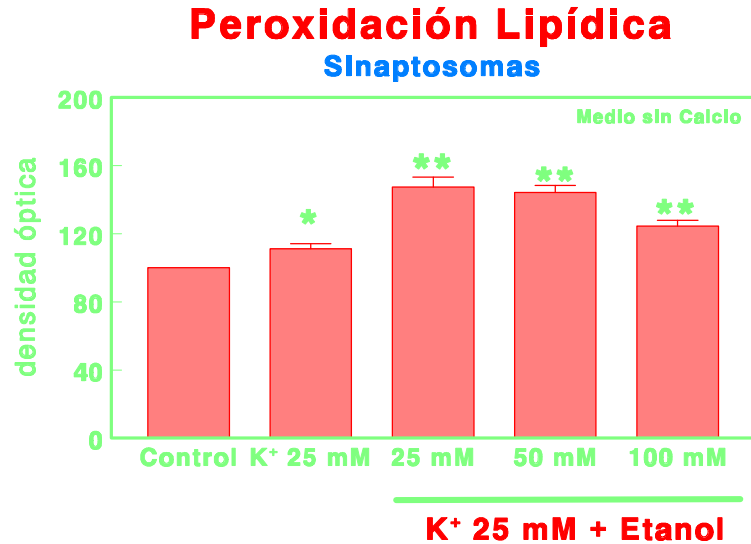
**Figura IV.1.13.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.14.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05).



**Figura IV.1.15.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.16.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).

**1.4. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL NIVEL DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre el nivel de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.7.*): El etanol no produce modificación significativa alguna del nivel de oxidación proteica ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio (*figuras IV.1.17.* y *IV.1.18.*).

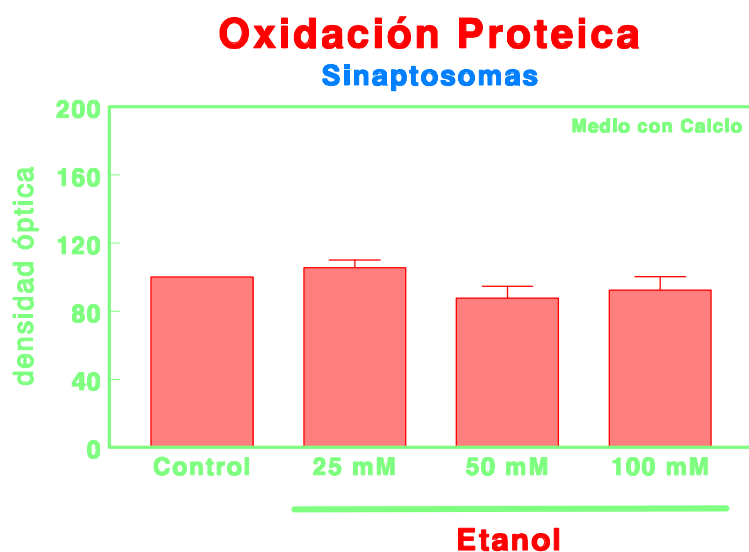
El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación sobre los niveles de oxidación proteica tras la estimulación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.1.8.*): El estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no produce ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación modificación significativa alguna respecto a los valores control de los niveles de oxidación proteica (*figuras IV.1.19.* y *IV.1.20.*). La incubación simultánea de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol, a cualquiera de las concentraciones de etanol utilizadas, tampoco produce modificaciones significativas de los niveles de oxidación proteica ni en presencia ni en ausencia de calcio en el medio de incubación (*tabla IV.1.8.*, *figuras IV.1.19.* y *IV.1.20.*).

	Sinaptosomas	
	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>EtOH 25 mM</b>	105.56±4.46	97.03±5.38
<b>EtOH 50 mM</b>	87.63±7.01	113.98±9.45
<b>EtOH 100 mM</b>	92.52±7.68	97.46±2.94

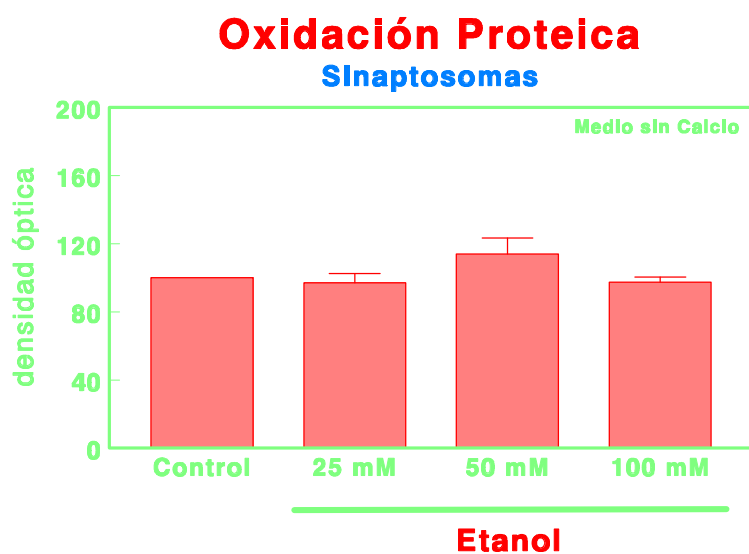
**Tabla IV.1.7.** Valores basales de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas	
	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	97.50±5.40	95.76±2.68
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	105.56±8.32	97.46±1.96
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	110.09±6.35	86.16±14.72
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	98.02±7.58	95.34±2.33

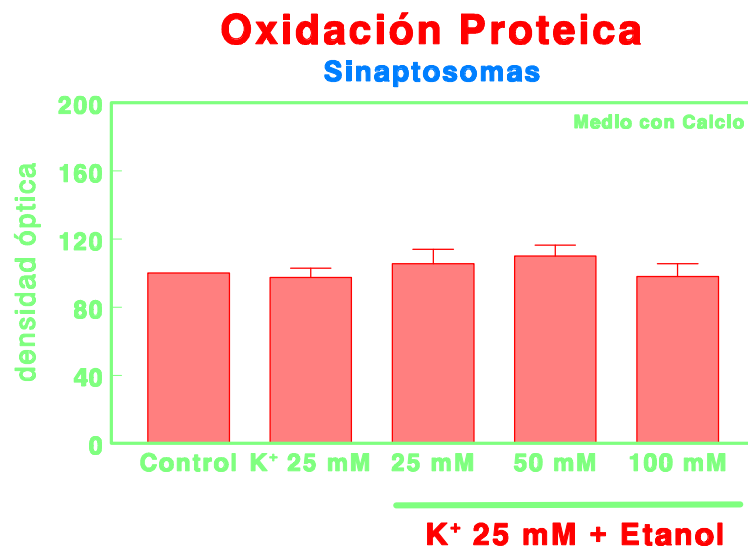
**Tabla IV.1.8.** Valores de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



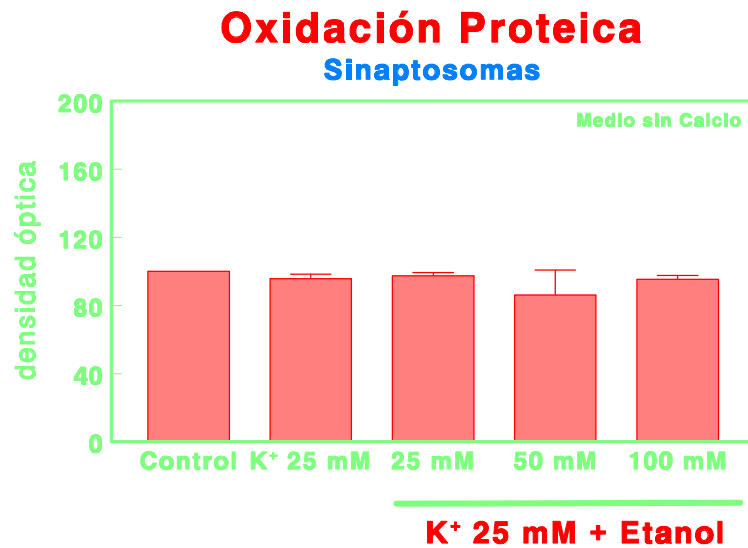
**Figura IV.1.17.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.18.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles basales de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.19.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.1.20.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre los niveles de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).

### **1.5. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ALANINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce una inhibición dosis-dependiente de esta actividad enzimática (*tabla IV.1.9., figura IV.1.21.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 13.23% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 19.05% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 49.34% ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP. En ausencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AlaAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.9., figura IV.1.22.*). Así, etanol 25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM tampoco produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 34.84% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de AlaAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce un aumento de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.1.9., figura IV.1.23.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 58.67% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 66.15% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 55.59% ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP en el medio de incubación. Por el contrario, en ausencia de calcio (*tabla IV.1.9., figura IV.1.24.*), el etanol, a ninguna de las concentraciones utilizadas, produce modificación significativa alguna de la actividad específica basal de AlaAP en el medio de incubación y con respecto al control.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 23.54% (*tabla IV.1.10., figura IV.1.25.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad AlaAP en un 12.18% con respecto al control (*tabla IV.1.10., figura IV.1.26.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol, en presencia de calcio, produce una disminución de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.1.10., figura IV.1.25.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de

etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 58.99% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 22.75% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100mM provoca una inhibición del 40.34% ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP. Por el contrario, en ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AlaAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.10., figura IV.1.26.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 18.13% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) del 28.90% y 18.98% respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de AlaAP.

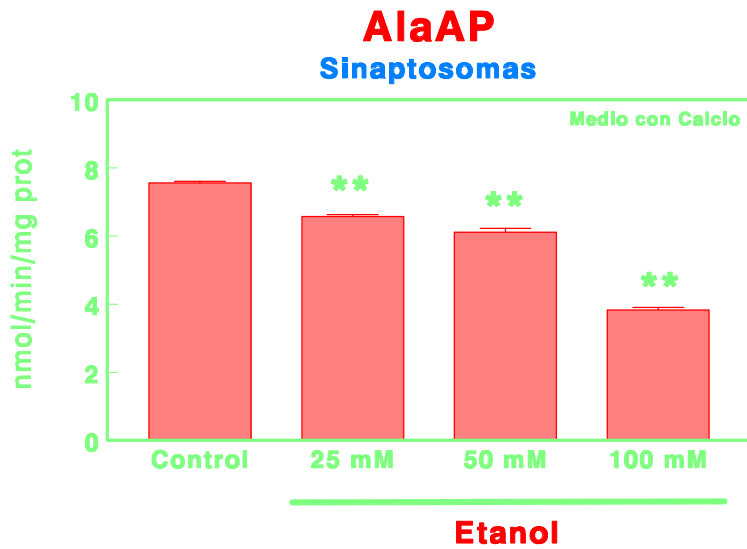
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 243.49% (*tabla IV.1.10., figura IV.1.27.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente la actividad AlaAP con respecto al control en el medio de incubación (*tabla IV.1.10., figura IV.1.28.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un aumento de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.1.10, figura IV.1.27.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 52.21% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 30.77% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 32.72% ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP. Por el contrario, en ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AlaAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.10., figura IV.1.28.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 40.20% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 29.40% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de AlaAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	7.56±0.055	3.53±0.122	9.75±0.199	5.00±0.119
<b>EtOH 25 mM</b>	6.56±0.055	3.29±0.038	15.47±0.701	4.70±0.127
<b>EtOH 50 mM</b>	6.12±0.104	3.67±0.098	16.20±0.939	3.99±0.389
<b>EtOH 100 mM</b>	3.83±0.069	2.30±0.139	15.17±0.540	4.28±0.289

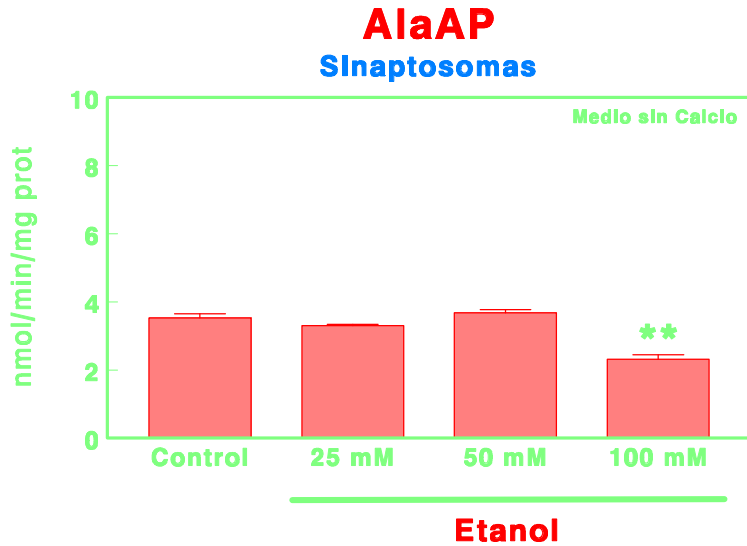
**Tabla IV.1.9.** Valores basales de actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	7.56±0.055	3.53±0.122	9.75±0.199	5.00±0.119
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.78±0.078	3.10±0.050	33.49±1.413	5.54±0.232
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	3.10±0.051	4.17±0.061	14.84±0.359	5.82±0.289
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	5.84±0.068	2.51±0.338	12.75±0.188	2.99±0.191
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	4.51±0.094	2.86±0.516	12.94±0.516	3.53±0.403

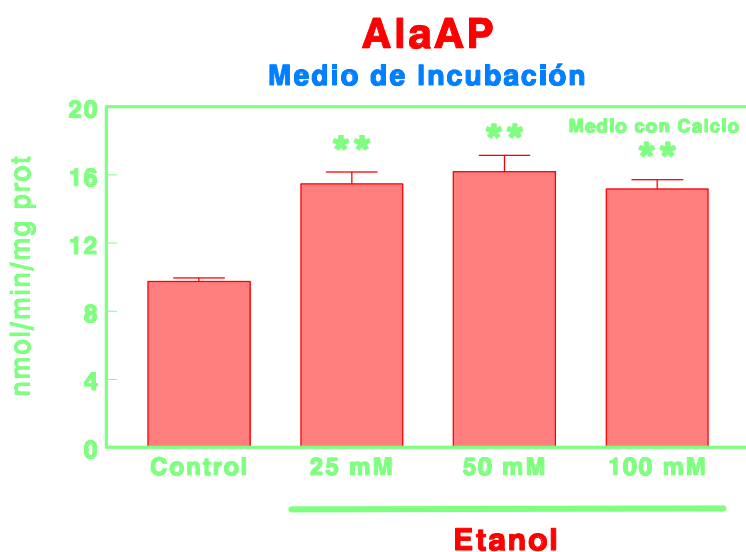
**Tabla IV.1.10.** Valores de actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



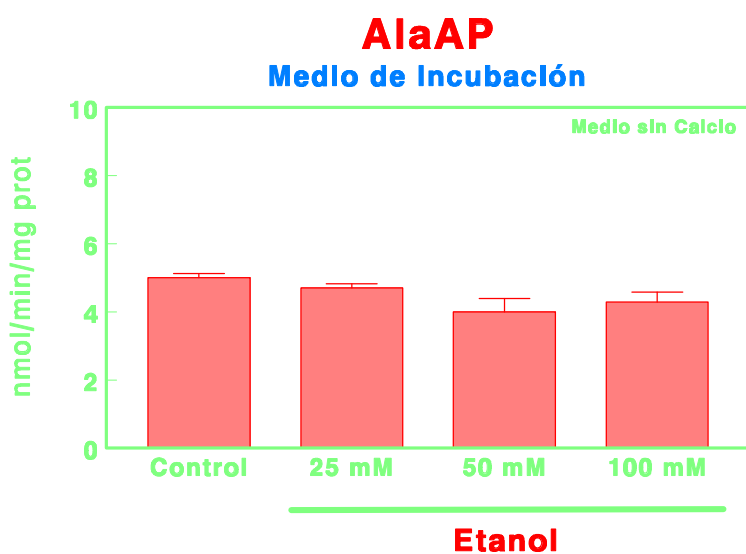
**Figura IV.1.21.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



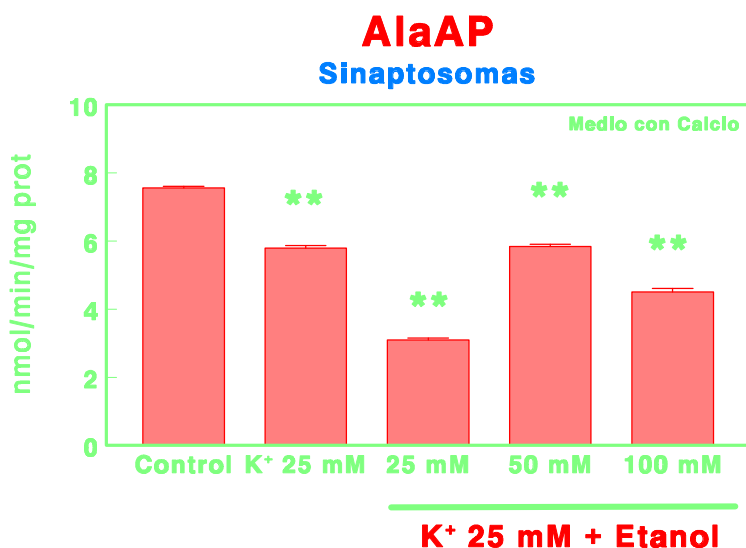
**Figura IV.1.22.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



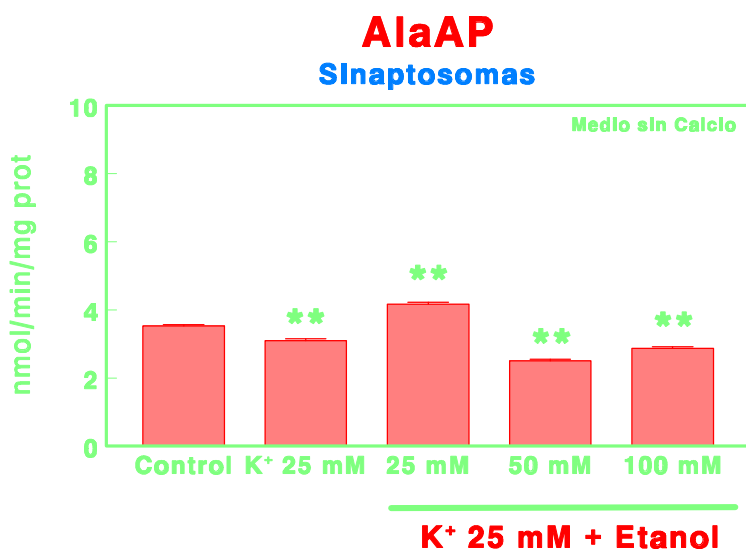
**Figura IV.1.23.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



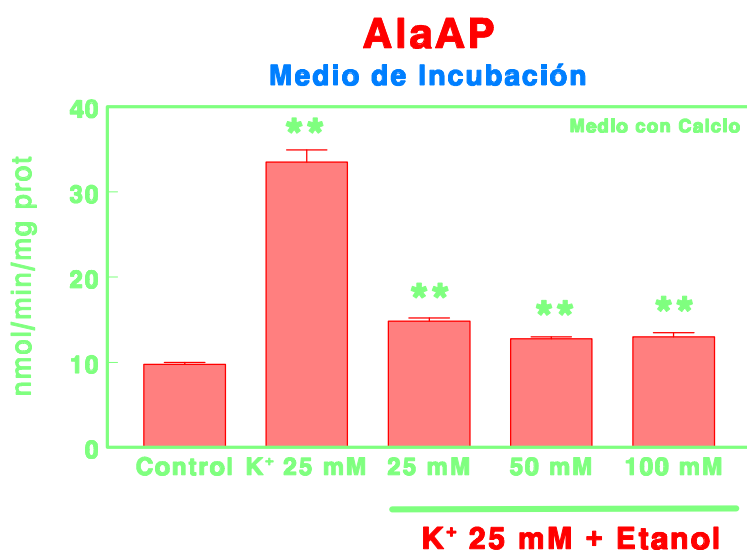
**Figura IV.1.24.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11).



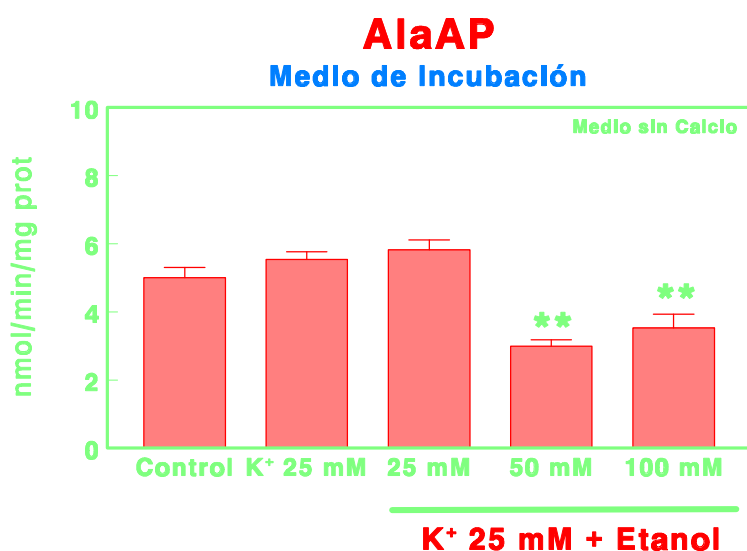
**Figura IV.1.25.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.26.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.27.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.28.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.6. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ARGININA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de esta actividad enzimática dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.11., figura IV.1.29.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 16.18% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 67.05% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 39.88% ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP. Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol produce una disminución dosis-dependiente de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.1.11., figura IV.1.30.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 16.88% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 18.11% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 38.87% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de ArgAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.1.11., figura IV.1.31.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 40.75% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 41.51% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 24.28% ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP en el medio de incubación. Por el contrario, en ausencia de calcio el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.1.11., figura IV.1.32.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 92.18% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 24.37% ( $p < 0.05$ ) de la actividad específica de ArgAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente esta actividad enzimática (*tabla IV.1.12., figura IV.1.33.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM

aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad ArgAP en un 6.79% con respecto al control (*tabla IV.1.12., figura IV.1.34.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de ArgAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.12., figura IV.1.33.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 26.88% ( $p < 0.01$ ), al igual que etanol 100 mM provoca una inhibición del 39.31% ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP. En ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de ArgAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.12., figura IV.1.34.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 13.58% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) del 27.55% y 12.08% respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de ArgAP.

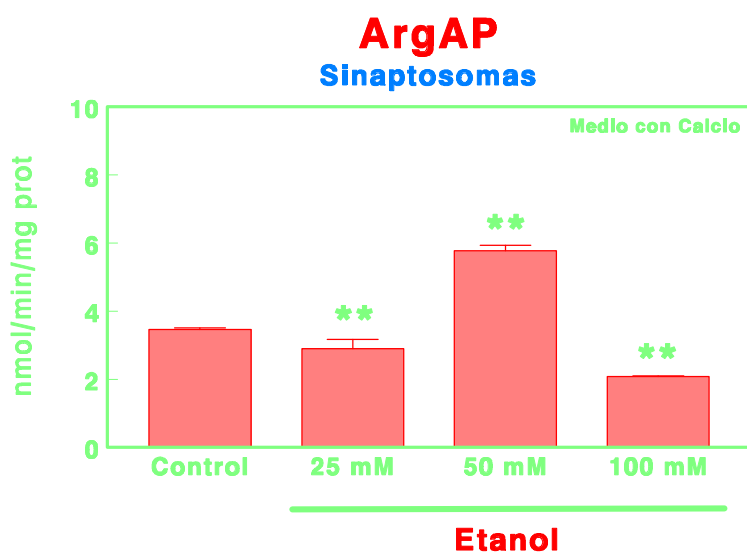
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) esta actividad enzimática en un 10.44% (*tabla IV.1.12., figura IV.1.35.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad ArgAP con respecto al control en el medio de incubación en un 11.72% (*tabla IV.1.12., figura IV.1.36.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de ArgAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.12., figura IV.1.35.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 41.26% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 27.67% ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP. Por el contrario, en ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol no produce modificación significativa alguna, a ninguna de las concentraciones de etanol utilizadas, de la actividad específica basal de ArgAP con respecto al control, en el medio de incubación (*tabla IV.1.12., figura IV.1.36.*).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	3.46±0.049	2.65±0.069	7.95±0.150	4.35±0.113
<b>EtOH 25 mM</b>	2.90±0.271	2.20±0.040	4.71±0.122	8.36±0.146
<b>EtOH 50 mM</b>	5.78±0.152	2.17±0.053	4.65±0.215	5.06±0.118
<b>EtOH 100 mM</b>	2.08±0.022	1.62±0.029	6.02±0.284	5.41±0.107

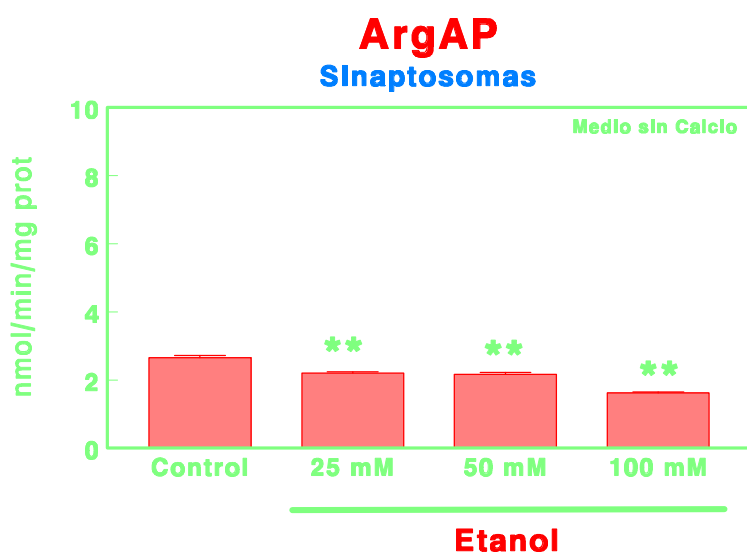
**Tabla IV.1.11.** Valores basales de actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Arg-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	3.46±0.049	2.65±0.069	7.95±0.150	4.35±0.113
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.53±0.058	2.83±0.034	8.78±0.230	3.84±0.048
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	3.14±0.053	3.01±0.023	11.23±0.170	4.59±0.155
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	2.53±0.035	1.92±0.029	8.26±0.146	4.12±0.143
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	2.10±0.059	2.33±0.042	5.75±0.295	4.59±0.075

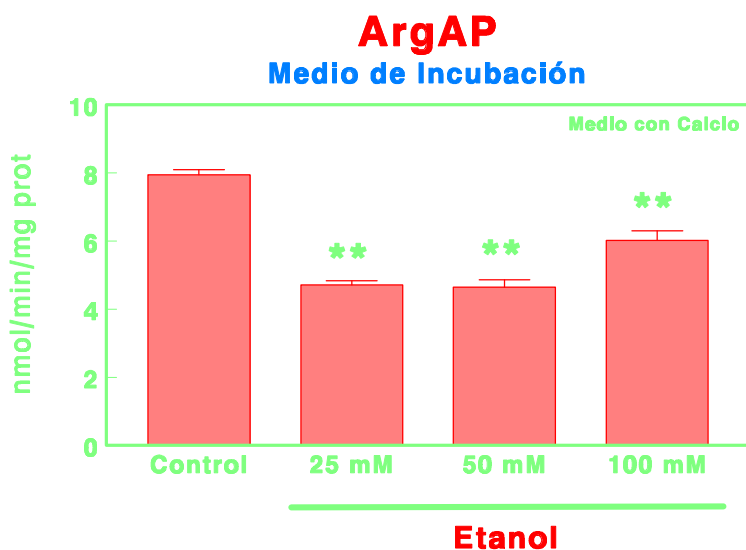
**Tabla IV.1.12.** Valores de actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Arg-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



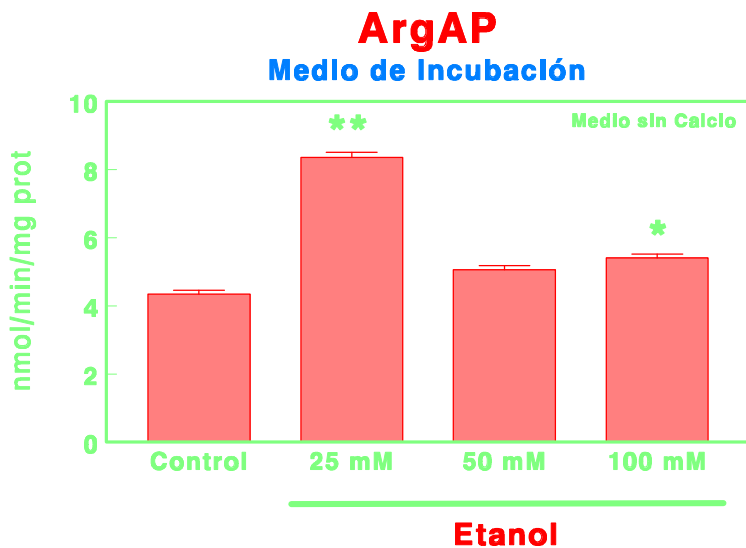
**Figura IV.1.29.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



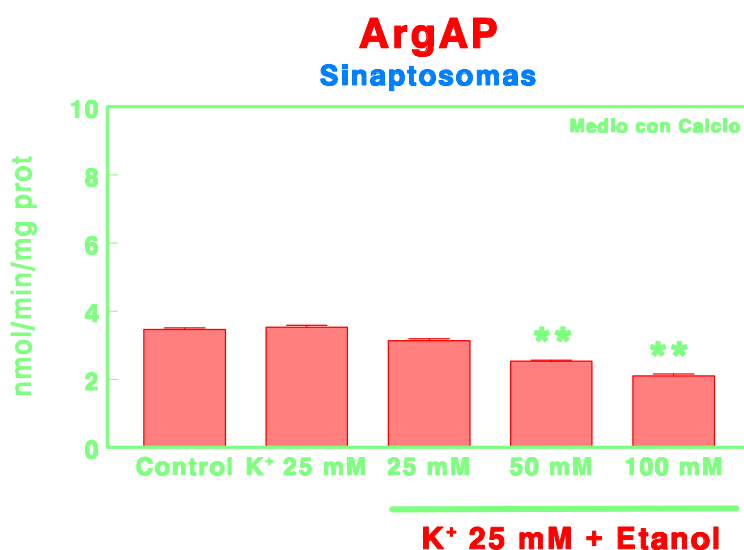
**Figura IV.1.30.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



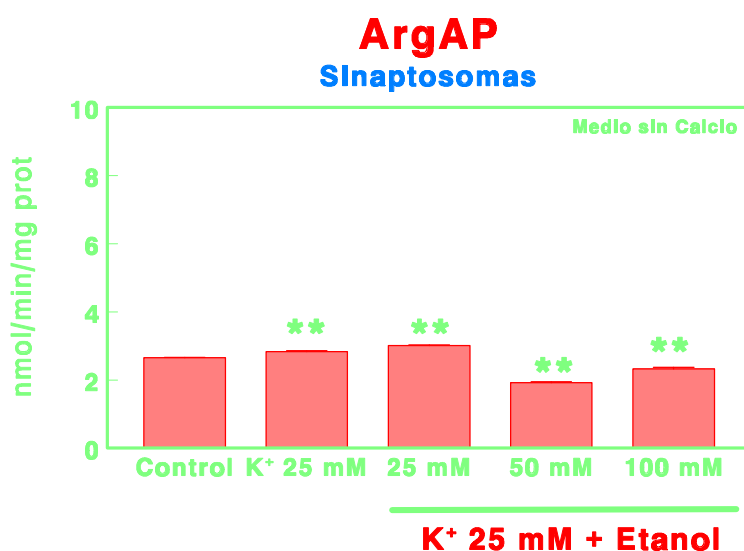
**Figura IV.1.31.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ;  $**p<0.01$ ).



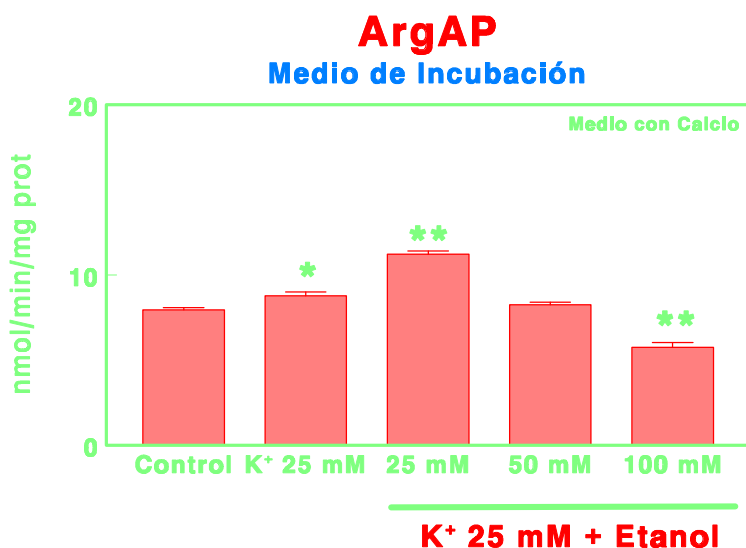
**Figura IV.1.32.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ;  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ).



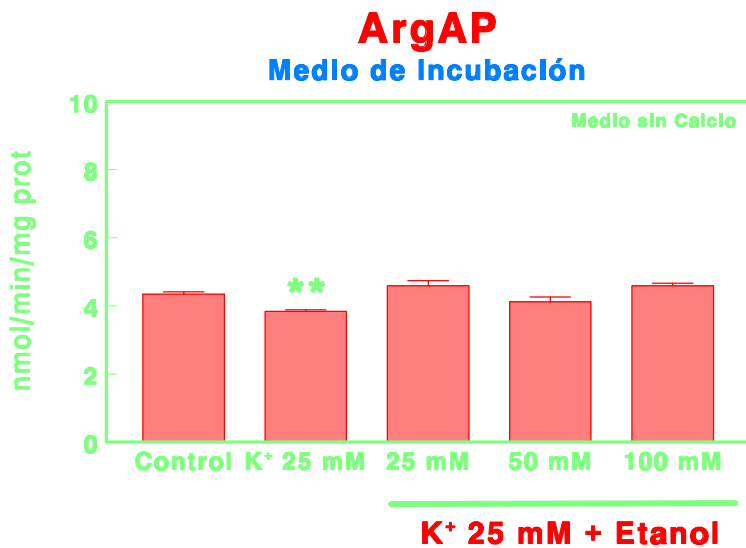
**Figura IV.1.33.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.34.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.35.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.36.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.7. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CISTEÍNA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución de esta actividad enzimática (*tabla IV.1.13.*, *figura IV.1.37.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 44.18% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 10.27% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 44.52% ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP. En ausencia de calcio el etanol también produce una disminución de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.1.13.*, *figura IV.1.38.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 54.55% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 15.56% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 47.47% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de CysAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de CysAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.13.*, *figura IV.1.39.*). Así, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 31.79% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 39.07% ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP en el medio de incubación. Por el contrario, en ausencia de calcio el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.1.9.*, *figura IV.1.24.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 18.08% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 33.02% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 19.25% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de CysAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente esta actividad enzimática (*tabla IV.1.14.*, *figura IV.1.41.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad CysAP en un 5.25% con respecto

al control (*tabla IV.1.14., figura IV.1.42.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de CysAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.14., figura IV.1.41.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 10.27% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 42.12% ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP. En ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de CysAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla 14, figura 42*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 21.21% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) del 28.48% y 20.20% respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de CysAP.

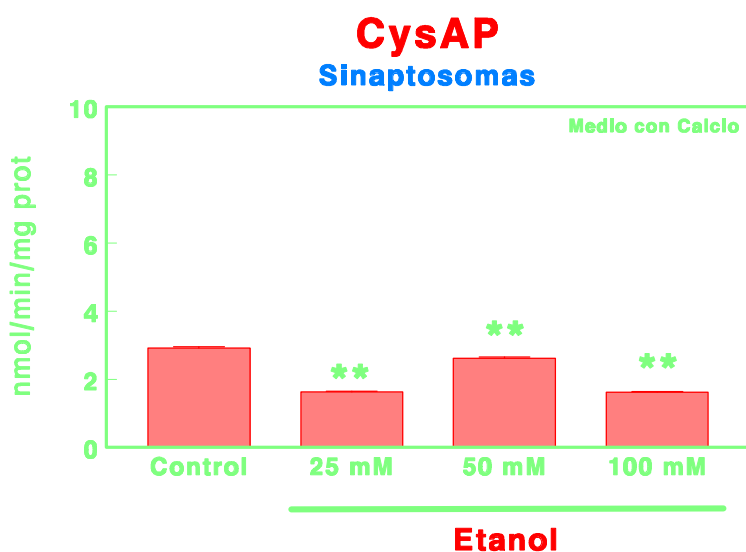
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) esta actividad enzimática en un 18.32% (*tabla IV.1.14., figura IV.1.43.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad CysAP con respecto al control en el medio de incubación en un 14.94% (*tabla 14, figura 44*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de CysAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.14., figura IV.1.43.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 69.70% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 97.35% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad CysAP. En ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de CysAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.14., figura IV.1.44.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 11.44% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 15.05% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad específica de CysAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	2.92±0.038	4.95±0.072	6.04±0.412	8.57±0.192
<b>EtOH 25 mM</b>	1.63±0.021	2.25±0.036	5.12±0.233	7.02±0.198
<b>EtOH 50 mM</b>	2.62±0.028	4.18±0.107	4.12±0.634	5.74±0.245
<b>EtOH 100 mM</b>	1.62±0.023	2.60±0.044	3.68±0.255	6.92±0.394

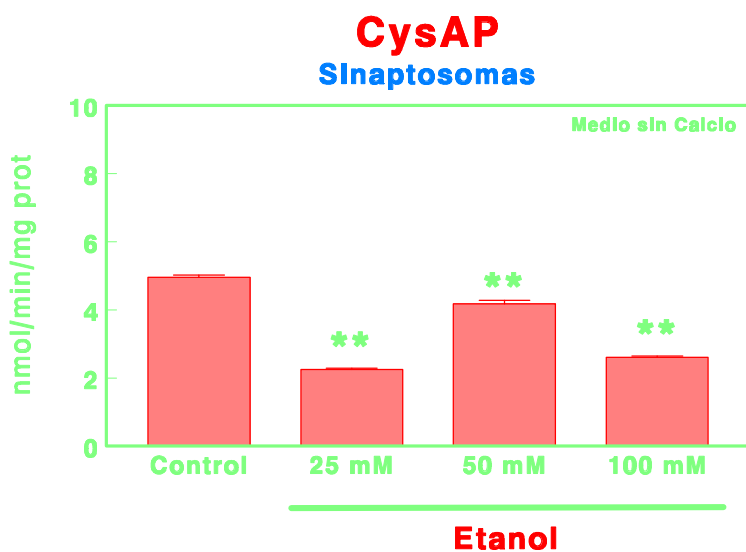
**Tabla IV.1.13.** Valores basales de actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	2.92±0.038	4.95±0.072	6.04±0.412	8.57±0.192
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	2.86±0.030	5.21±0.091	7.15±0.230	7.29±0.203
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	2.90±0.049	6.00±0.114	10.25±0.531	7.59±0.158
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	2.62±0.031	3.54±0.060	11.92±0.316	7.28±0.152
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	1.69±0.033	3.95±0.091	4.94±0.153	8.84±0.395

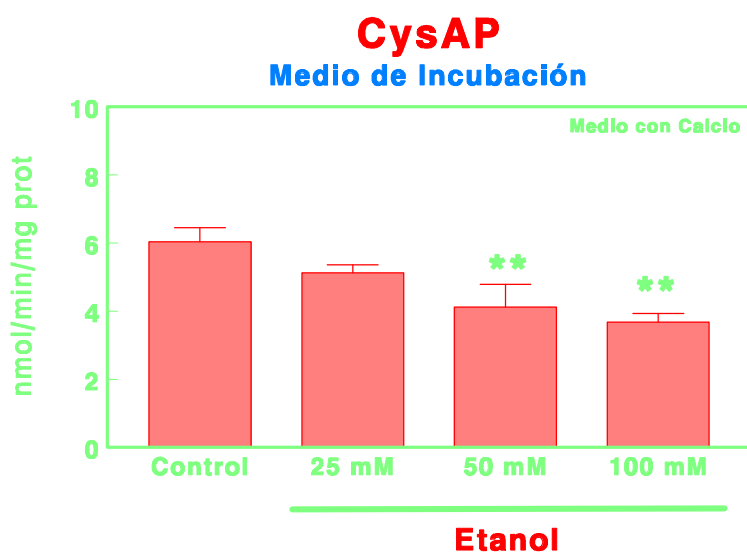
**Tabla IV.1.14.** Valores de actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



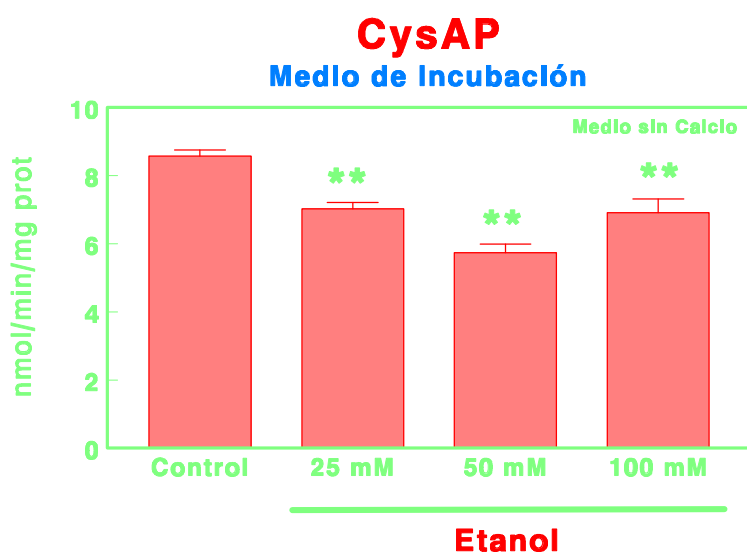
**Figura IV.1.37.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



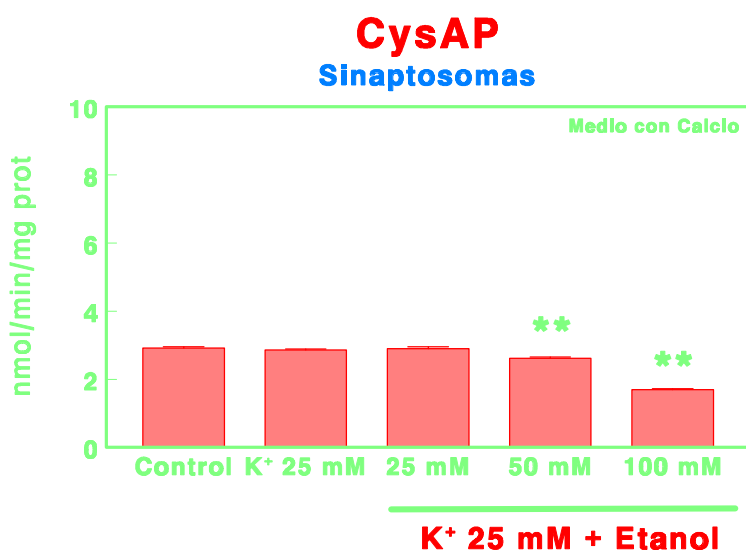
**Figura IV.1.38.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



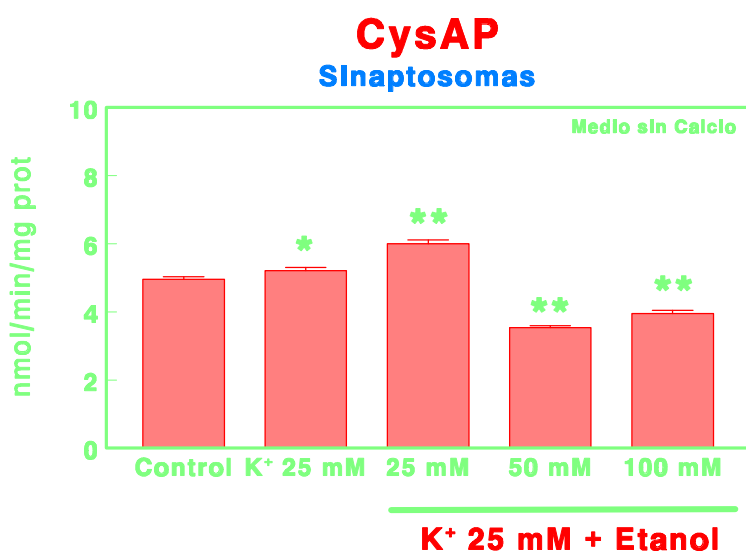
**Figura IV.1.39.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



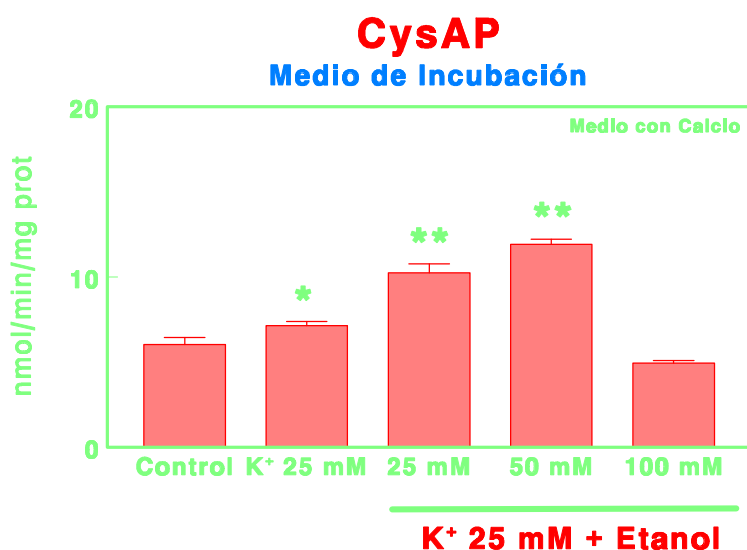
**Figura IV.1.40.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



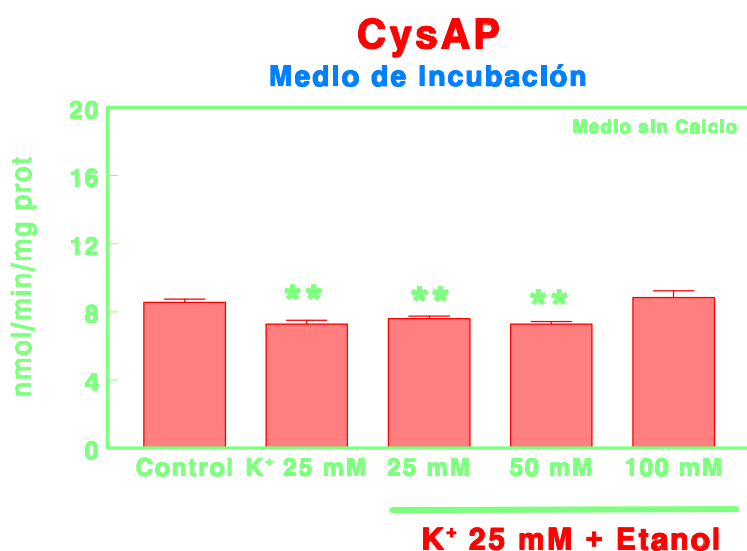
**Figura IV.141.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.142.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.143.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de CysAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.144.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de CysAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.8. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ASPARTATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución dosis-dependiente de esta actividad enzimática (*tabla IV.1.15.*, *figura IV.1.45.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 18.77% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 38.57% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 49.15% ( $p < 0.01$ ) de la actividad AspAP. En ausencia de calcio el etanol también produce una disminución de la actividad específica basal de AspAP (*tabla IV.1.15.*, *figura IV.1.46.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 52.10% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 59.05% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 46.62% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de AspAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.15.*, *figura IV.1.47.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 42.19% con respecto al control, mientras que la concentración 50 mM y 100 mM de etanol no produce modificación significativa alguna de esta actividad AspAP en el medio de incubación. En ausencia de calcio el etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.15.*, *figura IV.1.48.*). Así, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 22.91% ( $p < 0.05$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 53.52% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de AspAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 24.91% (*tabla IV.1.16.*, *figura IV.1.49.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM también aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad AspAP en un 20.11% con

respecto al control (*tabla IV.1.16., figura IV.1.50.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.16., figura IV.1.49.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 15.36% ( $p<0.01$ ), mientras que etanol 100 mM no provoca variación significativa alguna de la actividad AspAP. En ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.16., figura IV.1.50.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p<0.01$ ) del 12.98% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p<0.01$ ) del 25.78% y 18.65% respectivamente y con respecto al control en la actividad específica de AspAP.

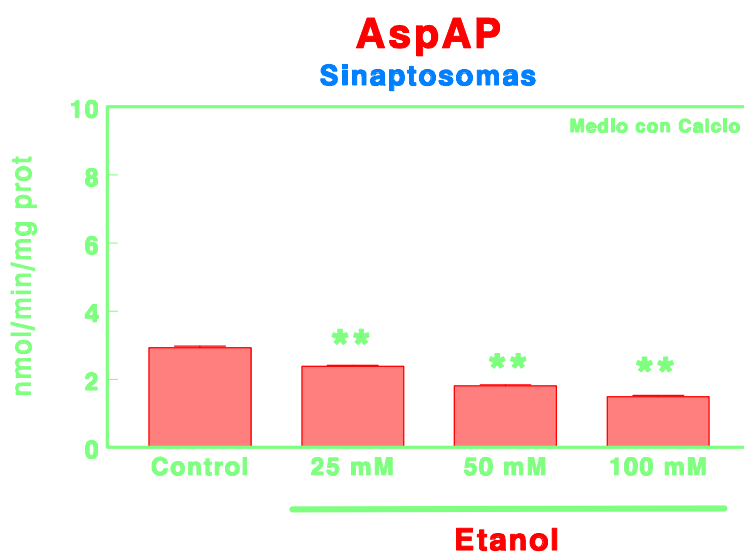
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p<0.01$ ) esta actividad enzimática en un 231.88% (*tabla IV.1.16., figura IV.1.51.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p<0.01$ ) la actividad AspAP con respecto al control en el medio de incubación en un 22.47% (*tabla IV.1.16., figura IV.1.52.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.16., figura IV.1.51.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 18.70% ( $p<0.05$ ), mientras que etanol 100 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad AspAP. En ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de AspAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.16., figura IV.1.52.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 17.18% ( $p<0.01$ ), mientras que etanol 100 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad específica de AspAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	2.93±0.044	5.47±0.128	9.41±0.372	4.54±0.133
<b>EtOH 25 mM</b>	2.38±0.032	2.62±0.062	13.38±0.356	5.03±0.243
<b>EtOH 50 mM</b>	1.80±0.040	2.24±0.590	10.19±0.321	5.58±0.405
<b>EtOH 100 mM</b>	1.49±0.039	2.92±0.112	9.98±0.249	2.11±0.145

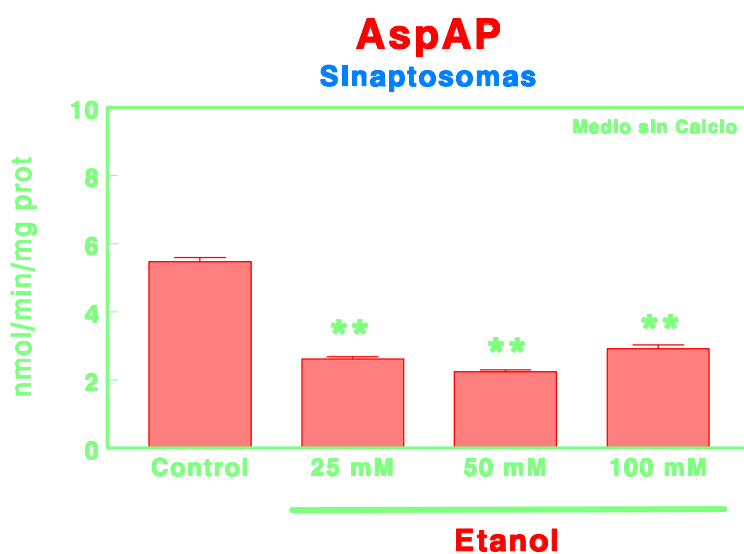
**Tabla IV.1.15.** Valores basales de actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	2.93±0.044	5.47±0.128	9.41±0.372	4.54±0.133
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.66±0.143	6.57±0.254	31.23±0.628	3.52±0.239
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	3.14±0.125	6.18±0.096	10.88±0.229	3.97±0.152
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	2.48±0.092	4.06±0.098	11.17±0.308	5.32±0.152
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	2.98±0.086	4.45±0.196	9.73±0.497	4.25±0.160

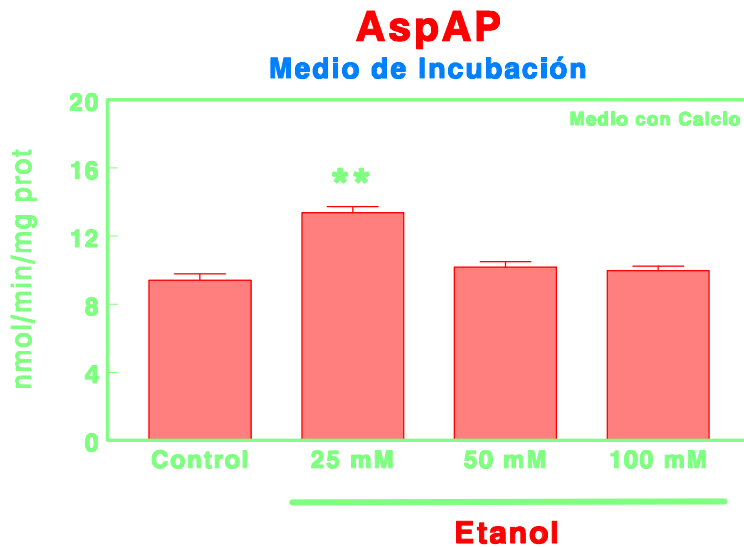
**Tabla IV.1.16.** Valores de actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



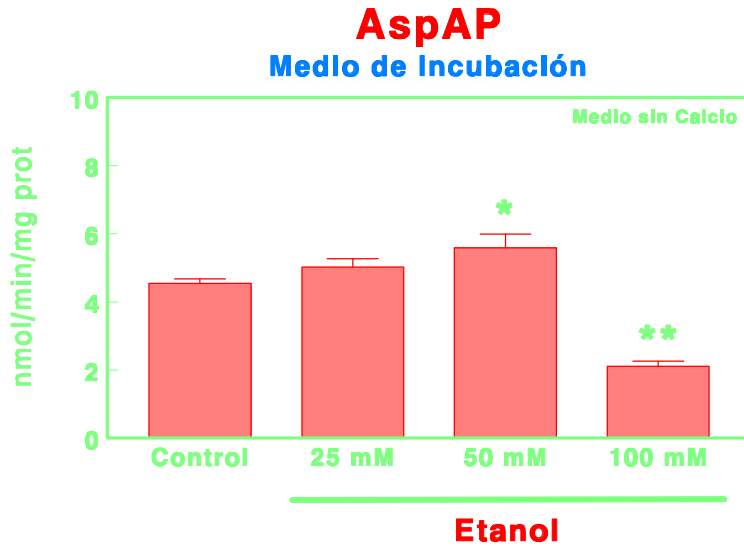
**Figura IV.145.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



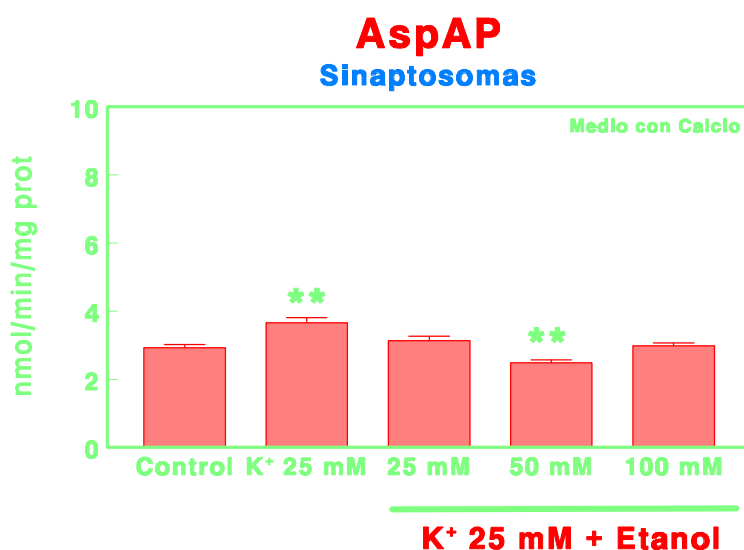
**Figura IV.146.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



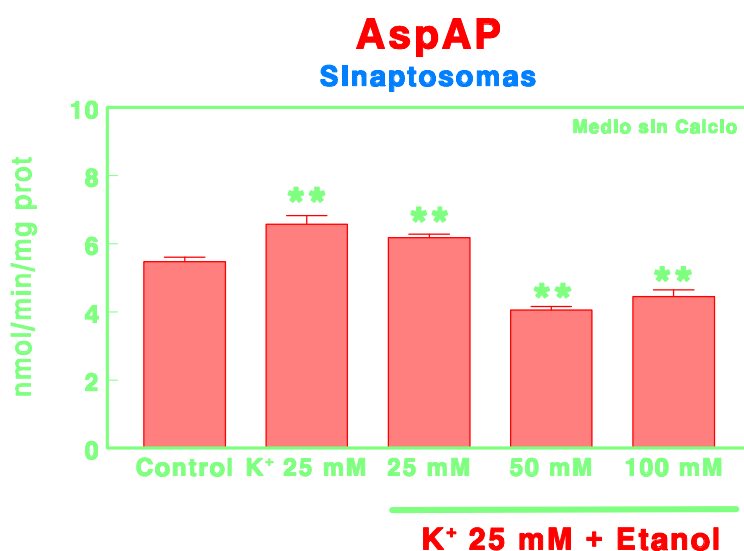
**Figura IV.147.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



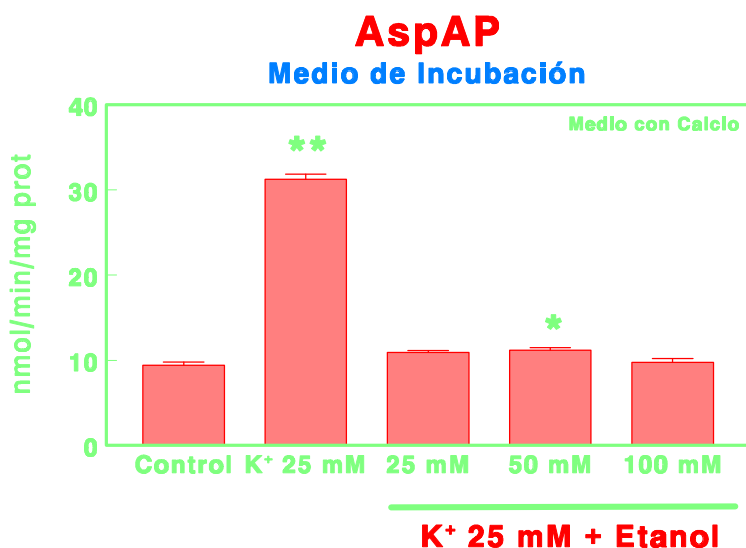
**Figura IV.148.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



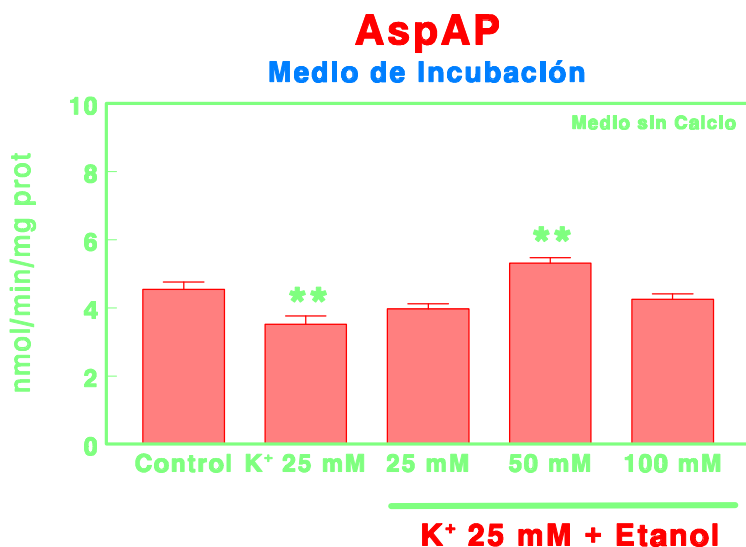
**Figura IV.1.49.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.50.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.51.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.52.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.9. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE GLUTAMATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución dosis-dependiente de esta actividad enzimática (*tabla IV.1.17., figura IV.1.53.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 49.15% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 54.25% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 65.31% ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP. En ausencia de calcio el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.1.17., figura IV.1.54.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 45.45% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 54.08% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 43.12% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de GluAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.1.17., figura IV.1.55.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) del 18.80% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 70.30% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 49.62% ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP en el medio de incubación. Por el contrario, en ausencia de calcio el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de GluAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.17., figura IV.1.56.*). Así, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 24.39% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 41.06% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de GluAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 27.55% (*tabla IV.1.18., figura IV.1.57.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM también aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad GluAP en un 4.90% con

respecto al control (*tabla IV.1.18., figura IV.1.58.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de GluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.18., figura IV.1.57.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del 20.41% con respecto al control, mientras que la concentración 50 mM y 100 mM no produce modificación significativa alguna de la actividad GluAP. En ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de GluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.18., figura IV.1.58.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 11.89% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) del 30.30% y 18.88% respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de GluAP.

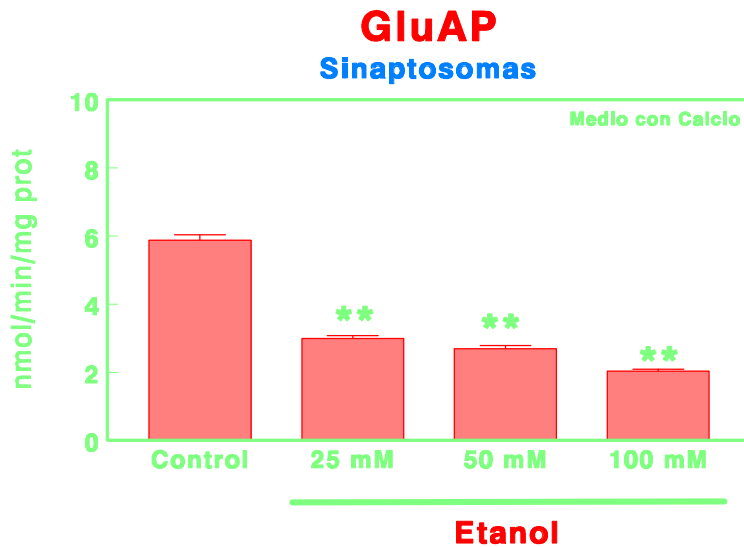
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 70.43% (*tabla IV.1.18., figura IV.1.59.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM también aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad GluAP con respecto al control en el medio de incubación en un 28.64% (*tabla IV.1.18., figura IV.1.60.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica de GluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.18., figura IV.1.59.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 8.02% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 7.02% ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP. Por el contrario, en ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol produce una disminución de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.1.18., figura IV.1.60.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 58.33% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 59.39% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 50.30% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de GluAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	5.88±0.156	4.29±0.138	3.99±0.116	6.60±0.184
<b>EtOH 25 mM</b>	2.99±0.086	2.34±0.076	3.24±0.159	7.02±0.175
<b>EtOH 50 mM</b>	2.69±0.100	1.97±0.057	1.19±0.156	8.21±0.546
<b>EtOH 100 mM</b>	2.04±0.050	2.44±0.069	1.98±0.118	2.71±0.072

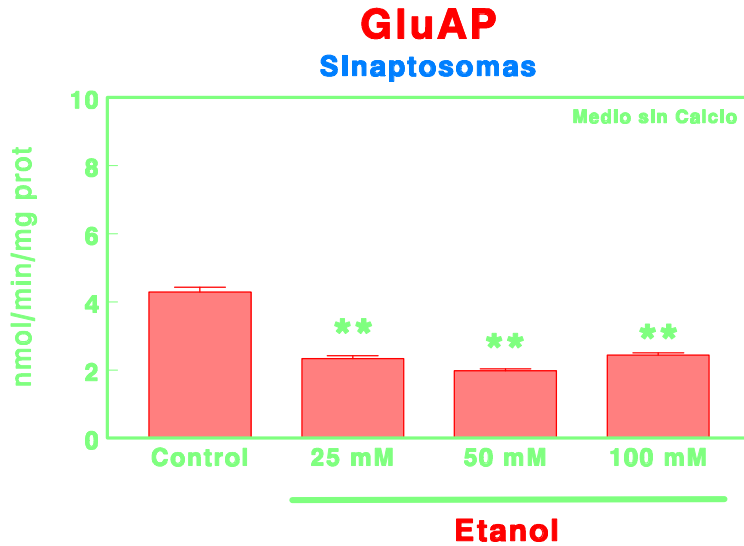
**Tabla IV.1.17.** Valores basales de actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	5.88±0.156	4.29±0.138	3.99±0.116	6.60±0.184
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	7.50±0.254	4.50±0.066	6.80±0.047	8.49±0.101
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	7.08±0.275	4.80±0.051	4.00±0.062	2.75±0.062
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	6.01±0.417	2.99±0.062	4.31±0.051	2.68±0.068
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	6.72±0.114	3.48±0.043	3.71±0.055	3.28±0.146

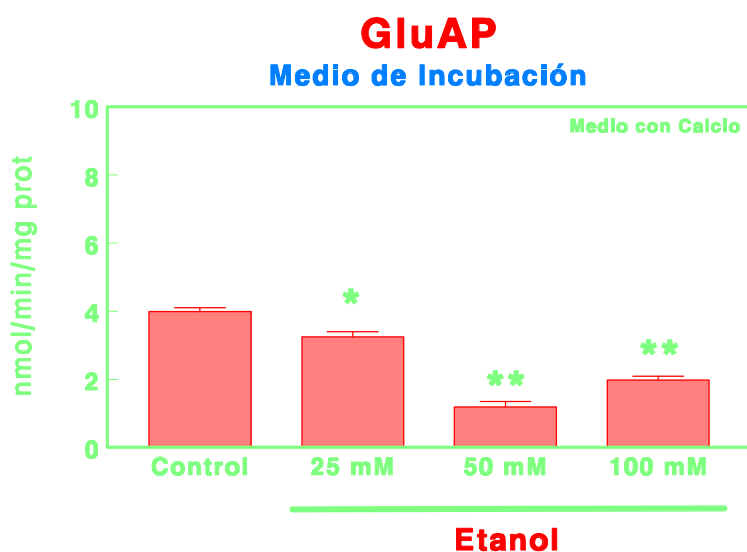
**Tabla IV.1.18.** Valores de actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



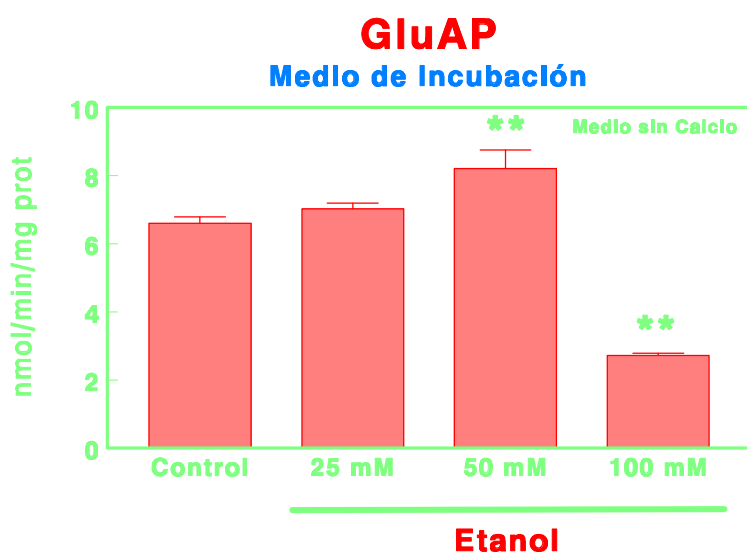
**Figura IV.1.53.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



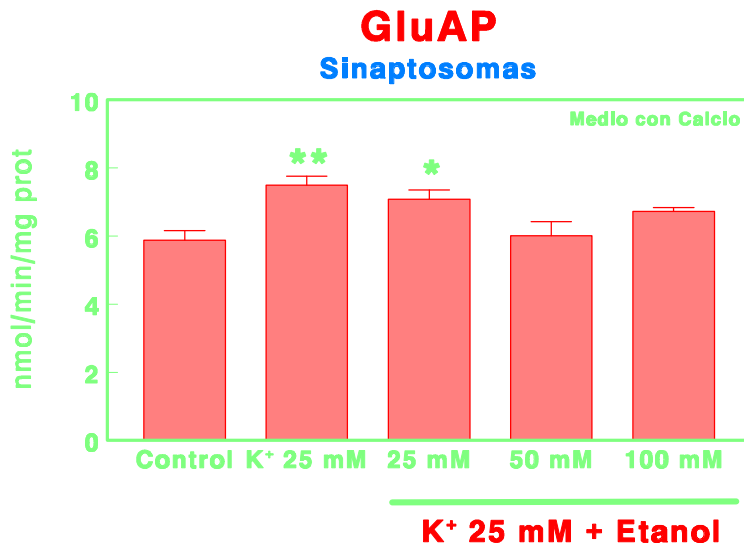
**Figura IV.1.54.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



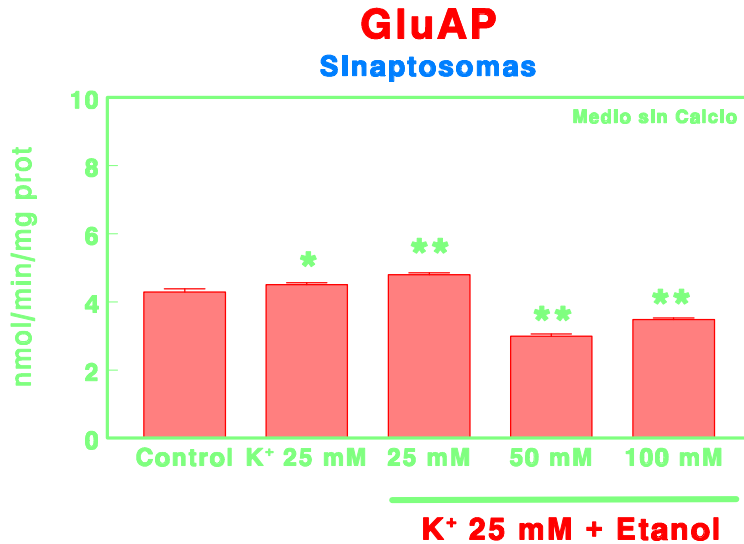
**Figura IV.155.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).



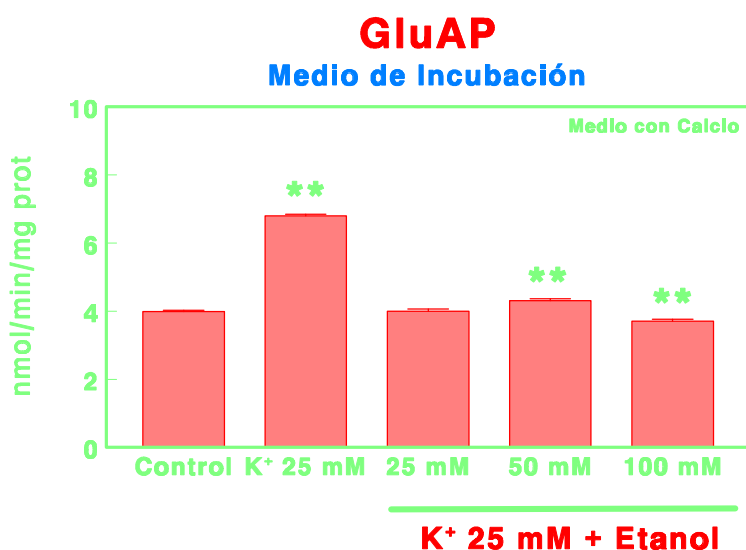
**Figura IV.156.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\* $p$ <0.01).



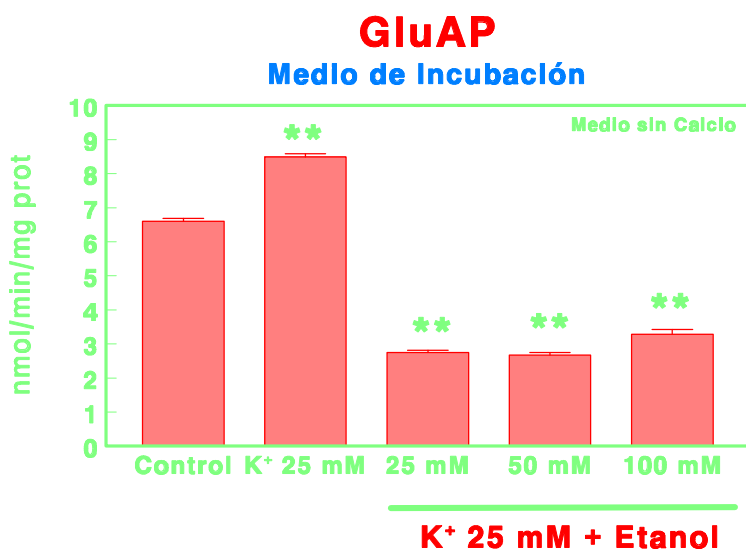
**Figura IV.157.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).



**Figura IV.158.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.59.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.60.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.10. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución dosis-dependiente de esta actividad enzimática (*tabla IV.1.19., figura IV.1.61.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 45.68% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 46.07% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 55.85% ( $p < 0.01$ ) de la actividad pGluAP. En ausencia de calcio el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.1.19., figura IV.1.62.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 49.77% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 55.12% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 46.28% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de pGluAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de pGluAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.19., figura IV.1.63.*). Así, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 40.55% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 21.87% ( $p < 0.05$ ) de la actividad pGluAP en el medio de incubación. En ausencia de calcio el etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de pGluAP dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.19., figura IV.1.64.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 21.43% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 33.33% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 58.53% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de pGluAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación tras, la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente esta actividad enzimática (*tabla IV.1.20.,*

*figura IV.1.65.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad pGluAP en un 9.77% con respecto al control (*tabla IV.1.20., figura IV.1.26.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce una disminución de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.1.20., figura IV.1.65.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 43.76% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 44.53% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100mM provoca una inhibición del 7.49% ( $p < 0.05$ ) de la actividad pGluAP. Por el contrario, en ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de pGluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.20., figura IV.1.66.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 22.56% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM provoca una disminución significativa ( $p < 0.01$ ) del 26.51% y 16.74% respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de pGluAP.

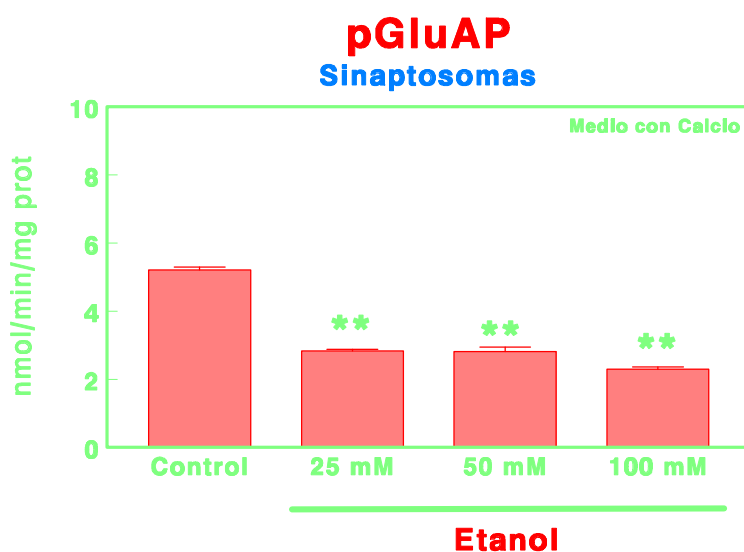
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 102.55% (*tabla IV.1.20., figura IV.1.67.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad pGluAP con respecto al control en el medio de incubación en un 28.57% (*tabla IV.1.20., figura IV.1.28.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de pGluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.20., figura IV.1.67.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 45.01% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 27.81% ( $p < 0.01$ ) de la actividad pGluAP. En ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol también produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de pGluAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.20., figura IV.1.68.*). Así, en estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 48.41% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 38.10% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de pGluAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	5.21±0.083	4.30±0.150	4.71±0.186	5.04±0.118
<b>EtOH 25 mM</b>	2.83±0.052	2.16±0.061	4.04±0.182	6.12±0.211
<b>EtOH 50 mM</b>	2.81±0.130	1.93±0.052	2.80±0.158	6.72±0.259
<b>EtOH 100 mM</b>	2.30±0.064	2.31±0.046	3.68±0.241	2.09±0.037

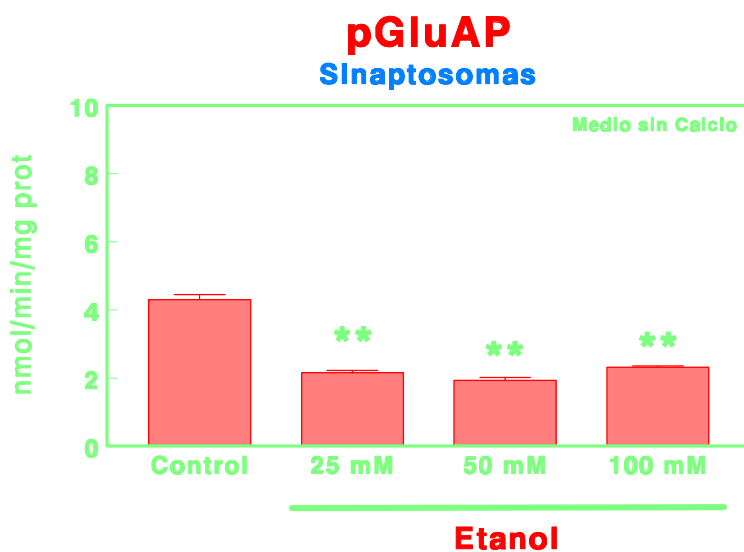
**Tabla IV.1.19.** Valores basales de actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	5.21±0.083	4.30±0.150	4.71±0.186	5.04±0.118
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.06±0.113	4.72±0.163	9.54±0.382	3.60±0.154
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	2.93±0.133	5.27±0.113	5.17±0.308	2.60±0.489
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	2.89±0.062	3.16±0.122	2.59±0.054	4.73±0.453
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	4.82±0.169	3.58±0.148	3.40±0.207	6.96±0.173

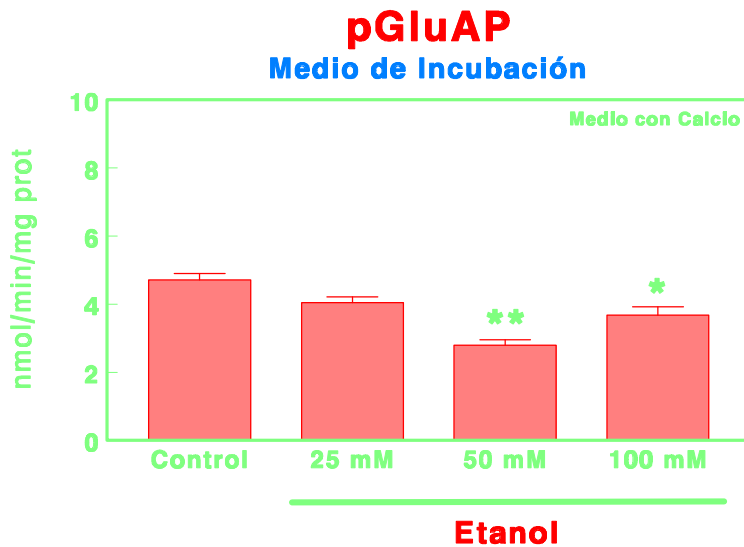
**Tabla IV.1.20.** Valores de actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



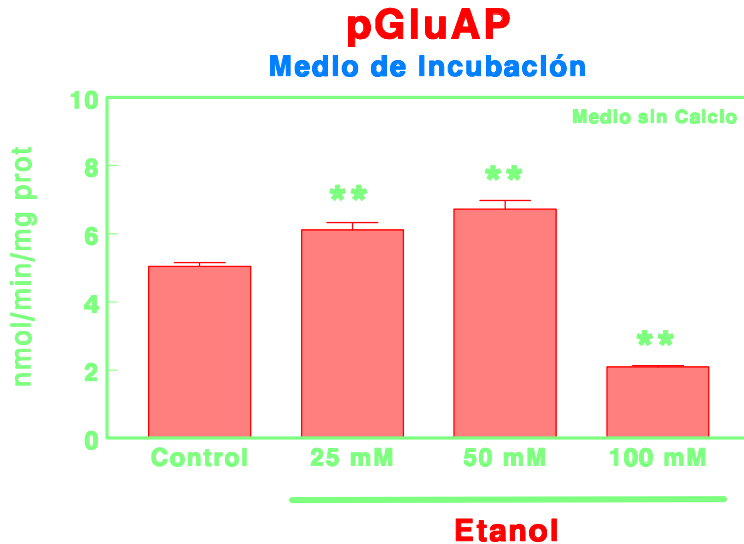
**Figura IV.1.61.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



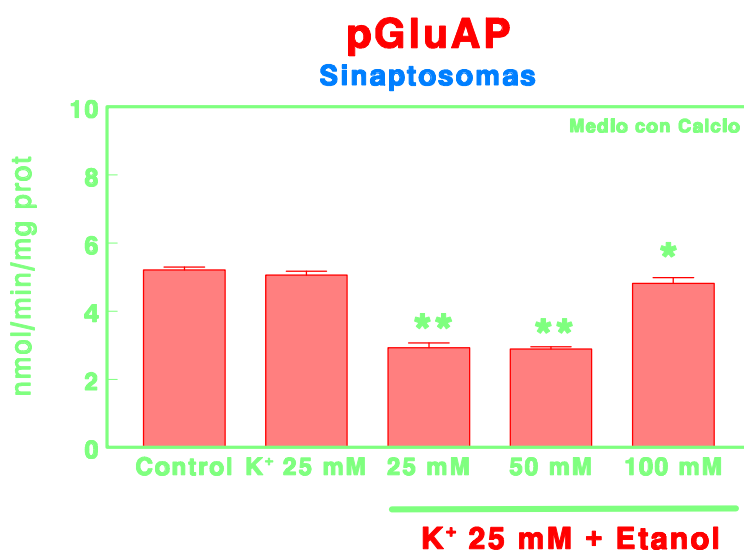
**Figura IV.1.62.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



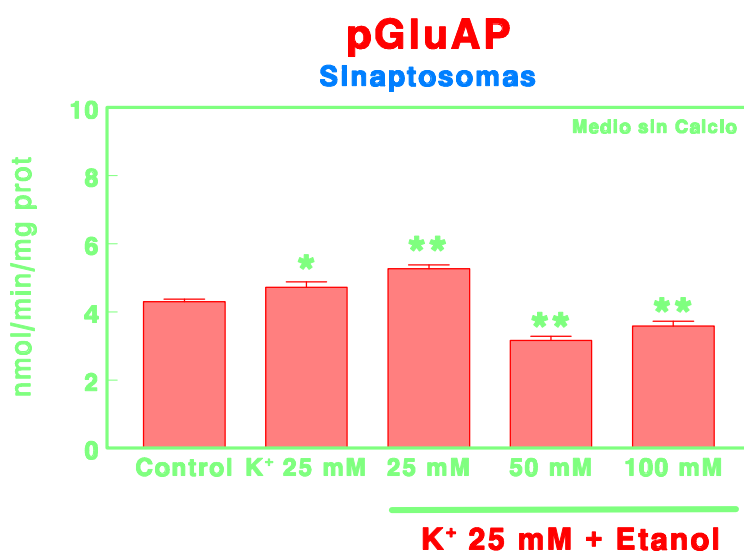
**Figura IV.1.63.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



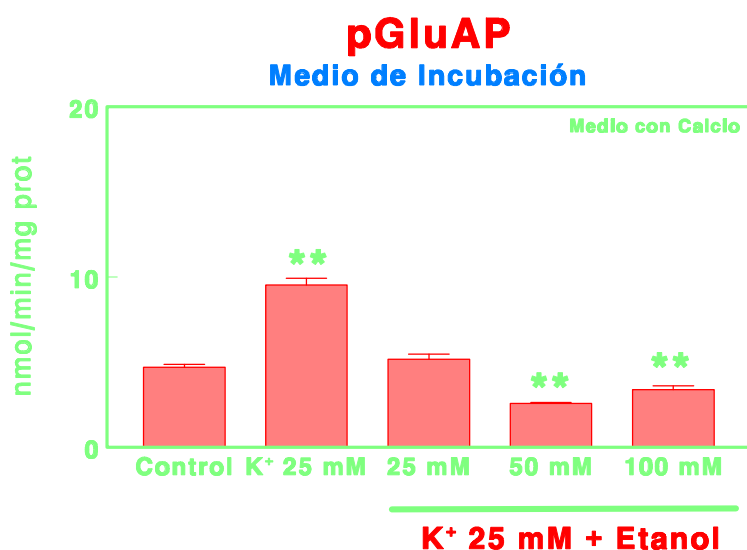
**Figura IV.1.64.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



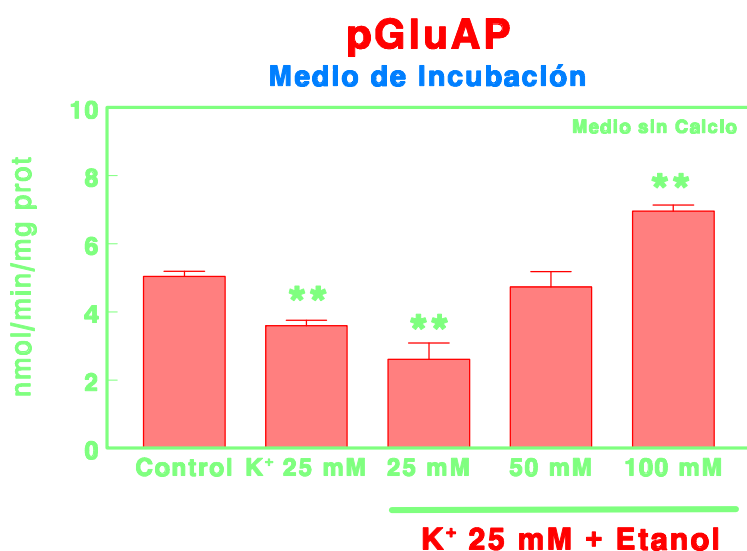
**Figura IV.1.65.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.66.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.01; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.67.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.68.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.11. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LEUCINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de esta actividad enzimática dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.21., figura IV.1.69.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 24.55% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un incremento de esta actividad enzimática del 104.09% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 36.82% ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP. Por el contrario, en ausencia de calcio el etanol produce una inhibición de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.1.21., figura IV.1.70.*). Así, etanol 25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 57.50% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 4.07% ( $p < 0.05$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 37.56% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de LeuAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.1.21., figura IV.1.71.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 30.54% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 22.91% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 26.15% ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP en el medio de incubación. En ausencia de calcio, el etanol también produce una disminución de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.1.21., figura IV.1.72.*). Así, etanol 25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 48.94%, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 47.56% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 51.14% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de LeuAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no modifica significativamente esta actividad enzimática (*tabla IV.1.22., figura IV.1.73.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad LeuAP en un 13.94% con respecto al control (*tabla IV.1.22., figura IV.1.74.*). La incubación simultánea de sinaptosomas

con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce una disminución dosis-dependiente de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.1.22., figura IV.1.73.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 10.45% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 28.03% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100mM provoca una inhibición del 55.15% ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP. Por el contrario, en ausencia de calcio, la incubación simultanea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de LeuAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.22., figura IV.1.74.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 18.49% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 11.42% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 28.85% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de LeuAP.

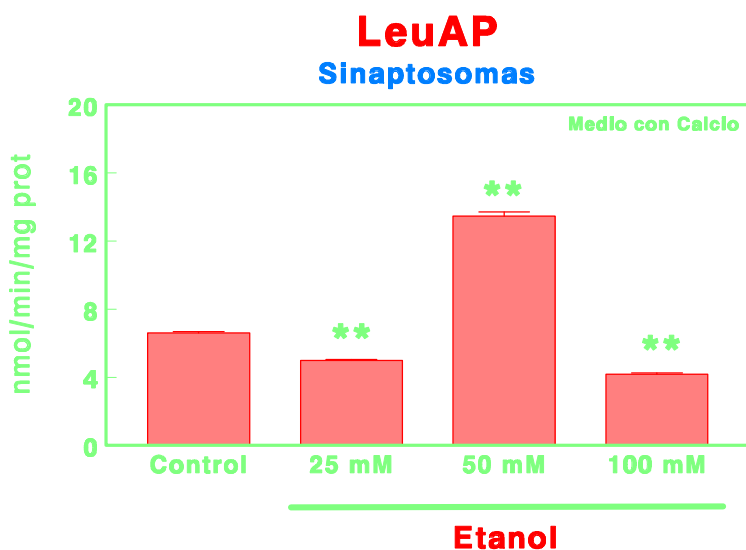
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 14.75% (*tabla IV.1.22., figura IV.1.75.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad LeuAP en un 46.50% con respecto al control en el medio de incubación (*tabla IV.1.22., figura IV.1.76.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de LeuAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.22., figura IV.1.75.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 29.60% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 35.25% ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP. Por el contrario, en ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol provoca una disminución de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.1.22., figura IV.1.76.*). Así, en estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 16.83% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 46.50% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 37.80% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de LeuAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	6.60±0.070	10.33±0.149	9.56±0.388	12.30±0.299
<b>EtOH 25 mM</b>	4.98±0.068	4.39±0.052	6.64±0.210	6.28±0.287
<b>EtOH 50 mM</b>	13.47±0.250	9.91±0.150	7.37±0.257	6.45±0.194
<b>EtOH 100 mM</b>	4.17±0.087	6.45±0.091	7.06±0.306	6.01±0.336

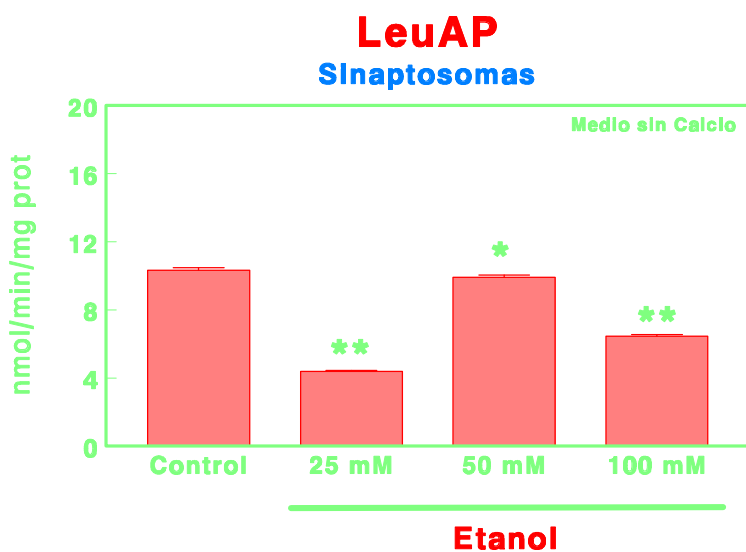
**Tabla IV.1.21.** Valores basales de actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	6.60±0.070	10.33±0.149	9.56±0.388	12.30±0.299
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.57±0.093	11.77±0.102	10.97±0.391	6.58±0.150
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	5.91±0.075	12.24±0.294	12.39±0.262	10.23±0.400
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	4.75±0.058	9.15±0.185	10.28±0.246	6.58±0.138
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	2.96±0.037	13.31±0.169	6.19±0.203	7.65±0.292

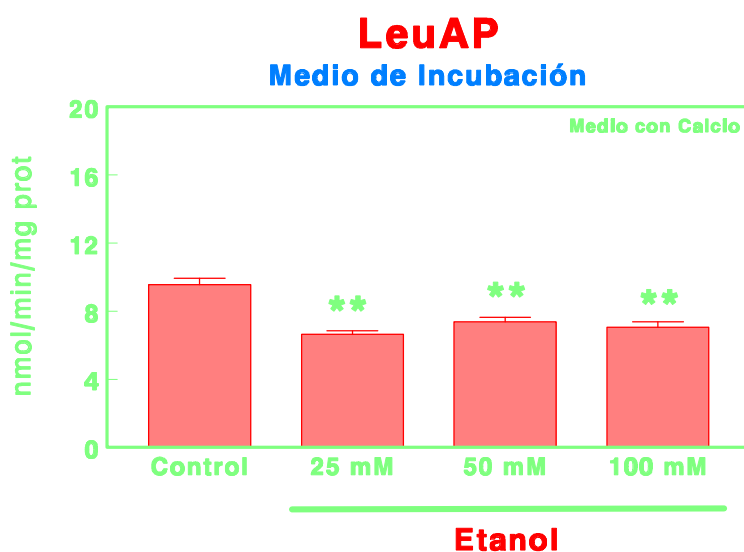
**Tabla IV.1.22.** Valores de actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



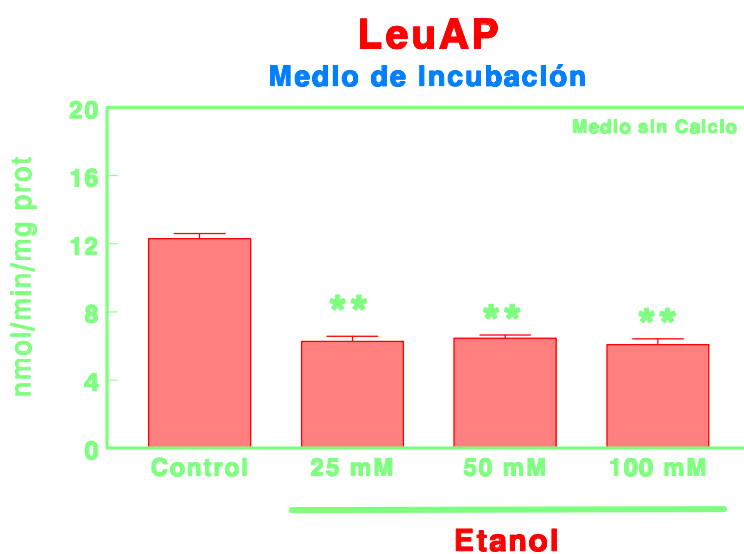
**Figura IV.1.69.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



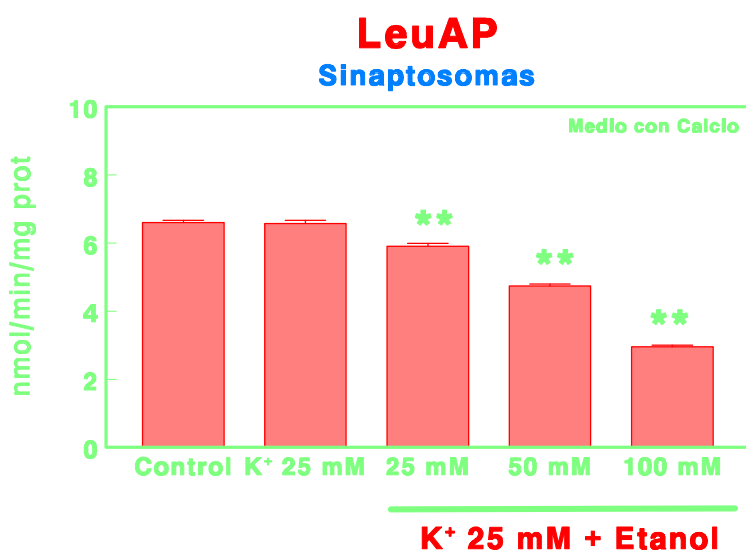
**Figura IV.1.70.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



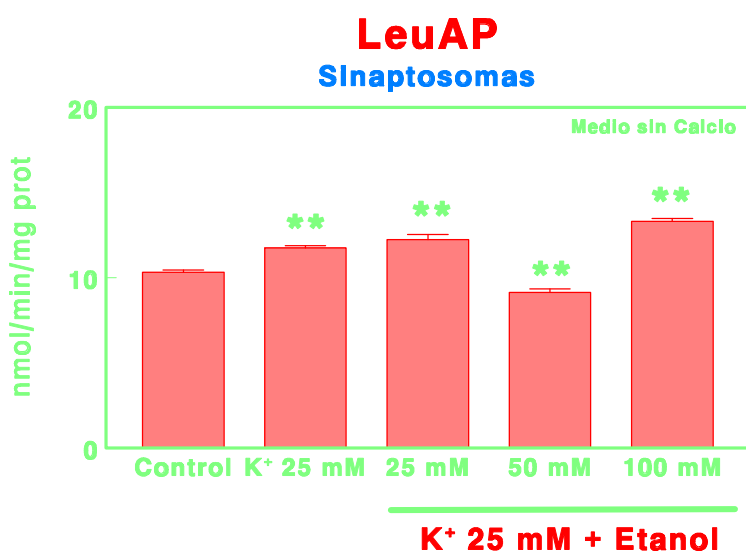
**Figura IV.171.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



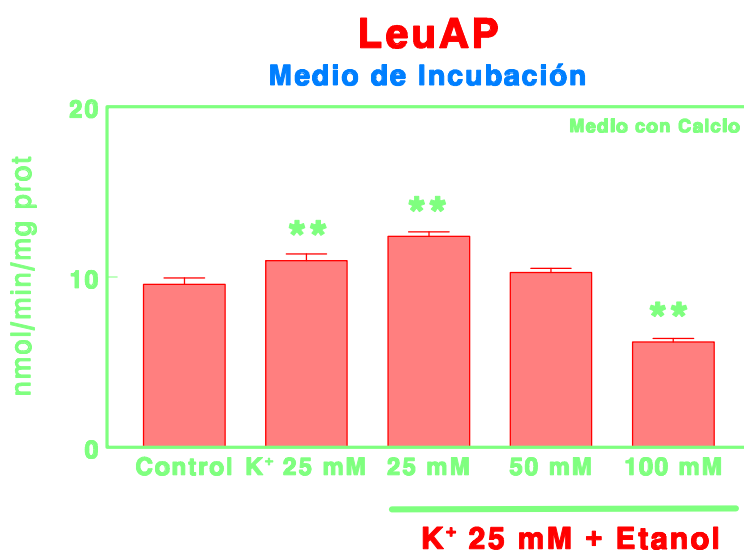
**Figura IV.172.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



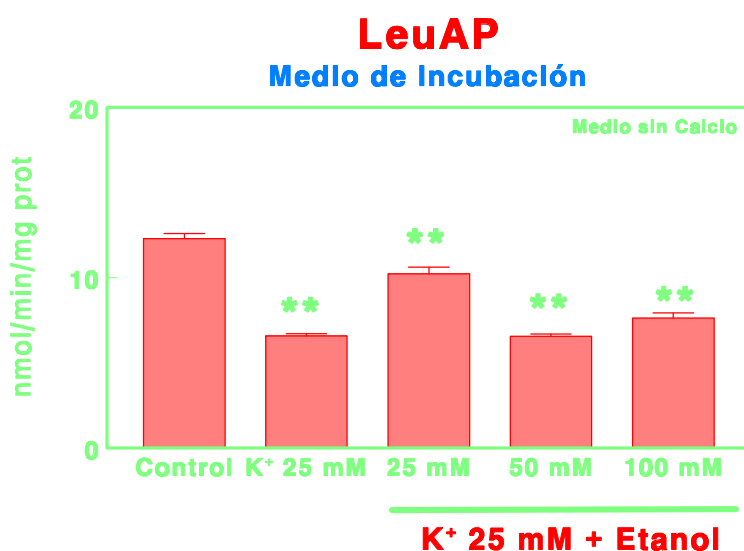
**Figura IV.1.73.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.74.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.175.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.176.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

### **1.12. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE TIROSINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos del etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el etanol produce un comportamiento diferencial de esta actividad enzimática dependiendo de la concentración utilizada (*tabla IV.1.23., figura IV.1.77.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 41.11% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 44.30% ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP. Por el contrario, en ausencia de calcio el etanol produce una disminución de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.1.23., figura IV.1.78.*). Así, etanol 25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 64.98% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 28.52% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 47.83% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de TyrAP.

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol produce una disminución dosis-dependiente de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.1.23., figura IV.1.79.*). Así, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 45.25% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 49.73% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 56.88% ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP en el medio de incubación. En ausencia de calcio, el etanol también produce una disminución de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.1.23., figura IV.1.80.*). Así, etanol 25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 28.09% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 43.17% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca una inhibición del 32.35% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de TyrAP en el medio de incubación.

El análisis de los efectos del etanol y la influencia del calcio en el medio sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 17.24% (*tabla IV.1.24., figura IV.1.81.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad TyrAP en un 8.66% con

respecto al control (*tabla IV.1.24., figura IV.1.82.*). La incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce una disminución de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.1.24., figura IV.1.81.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) del 20.69% con respecto al control, la concentración 50 mM produce una disminución de esta actividad enzimática del 34.22% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100mM provoca una inhibición del 33.16% ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP. Por el contrario, en ausencia de calcio, la incubación simultánea de sinaptosomas con  $K^+$  25 mM y etanol produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de TyrAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.24., figura IV.1.82.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 12.09% con respecto al control, mientras que etanol 50 mM y 100 mM produce una disminución del 20.58% ( $p < 0.01$ ) y 7.46% ( $p < 0.05$ ) respectivamente y con respecto al control de la actividad específica de TyrAP.

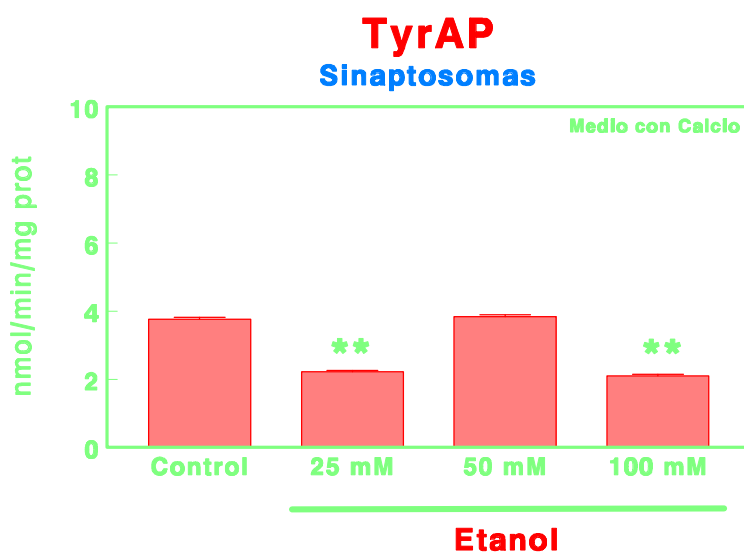
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) esta actividad enzimática en un 95.84% (*tabla IV.1.24., figura IV.1.83.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad TyrAP en un 19.59% con respecto al control en el medio de incubación (*tabla IV.1.24., figura IV.1.84.*). La incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol en presencia de calcio produce un comportamiento diferencial de la actividad específica basal de TyrAP dependiendo de la concentración de etanol utilizada (*tabla IV.1.24., figura IV.1.83.*). Así, ante estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 35.32% con respecto al control, la concentración 50 mM no produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 38.53% ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP. Por el contrario, en ausencia de calcio la incubación simultánea con  $K^+$  25 mM y etanol provoca un aumento de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.1.24., figura IV.1.84.*). Así, en estas condiciones despolarizantes, la concentración 25 mM de etanol provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 25.81% con respecto al control, la concentración 50 mM produce un aumento de esta actividad enzimática del 7.73% ( $p < 0.01$ ), mientras que etanol 100 mM provoca un incremento del 26.80% ( $p < 0.01$ ) de la actividad específica de TyrAP en el medio de incubación.

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin calcio
<b>Control</b>	3.77±0.047	5.54±0.110	9.37±0.916	7.76±0.204
<b>EtOH 25 mM</b>	2.22±0.033	1.94±0.039	5.13±0.329	5.58±0.246
<b>EtOH 50 mM</b>	3.84±0.055	3.96±0.091	4.71±0.299	4.41±0.244
<b>EtOH 100 mM</b>	2.10±0.043	2.89±0.070	4.04±0.305	5.25±0.207

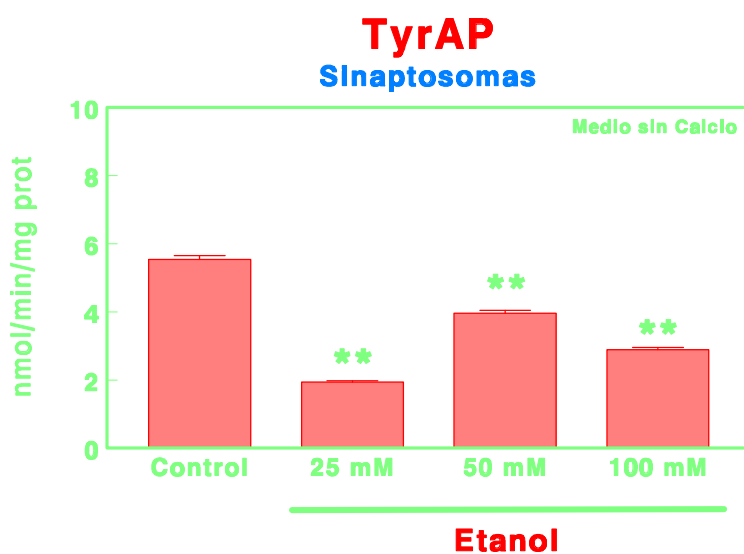
**Tabla IV.1.23.** Valores basales de actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones control y en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

	Sinaptosomas		Medio de incubación	
	Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	3.77±0.047	5.54±0.110	9.37±0.916	7.76±0.204
<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.12±0.049	6.02±0.095	18.35±0.427	6.24±0.207
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 25 mM</b>	2.99±0.055	6.21±0.132	12.68±0.276	9.56±0.210
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 50 mM</b>	2.48±0.073	4.40±0.127	8.61±0.362	8.36±0.231
<b>K<sup>+</sup> 25 mM + EtOH 100 mM</b>	2.52±0.056	5.11±0.114	12.98±0.693	9.84±0.434

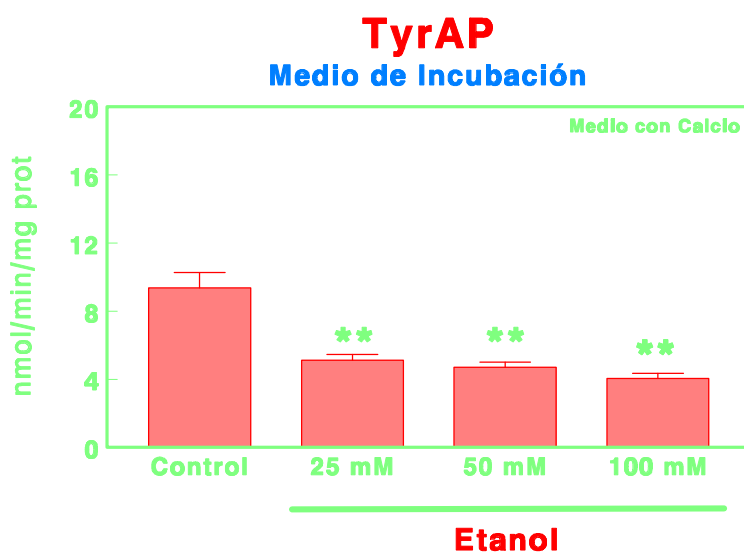
**Tabla IV.1.24.** Valores de actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación en condiciones basales (control), tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en presencia de etanol (EtOH) 25 mM, 50 mM y 100 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



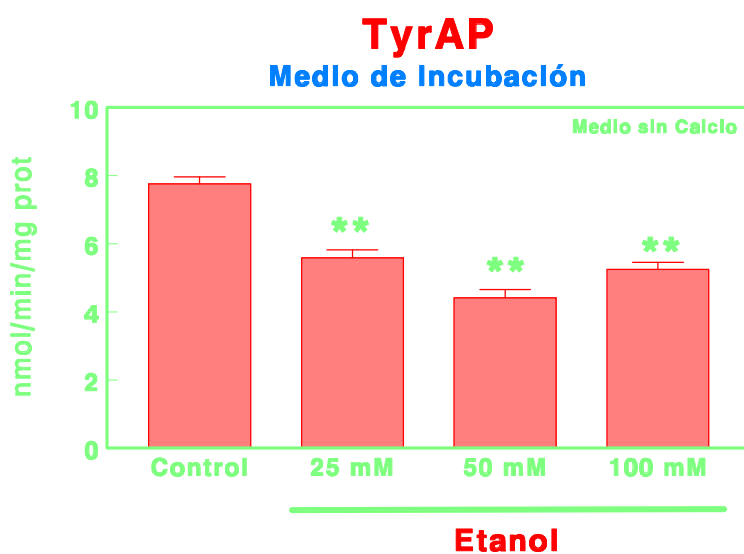
**Figura IV.1.77.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



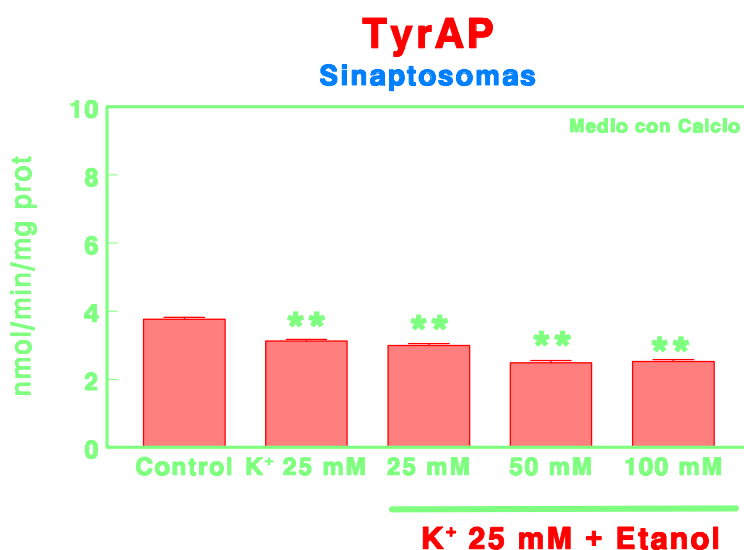
**Figura IV.1.78.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



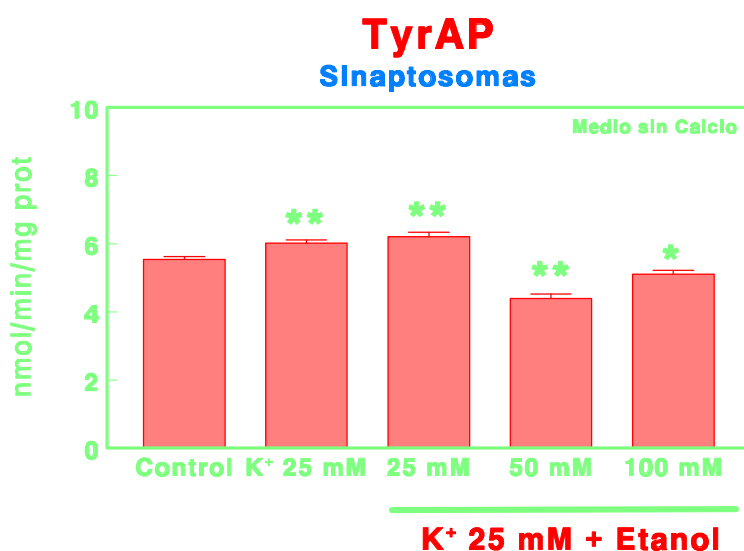
**Figura IV.1.79.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



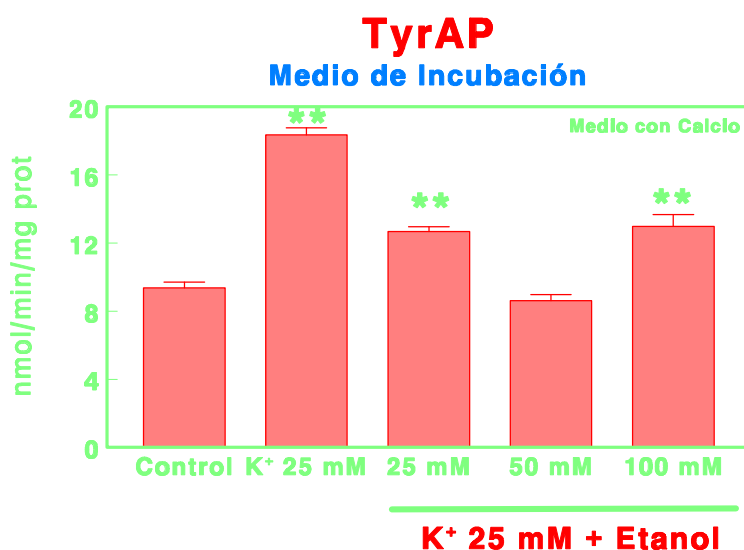
**Figura IV.1.80.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



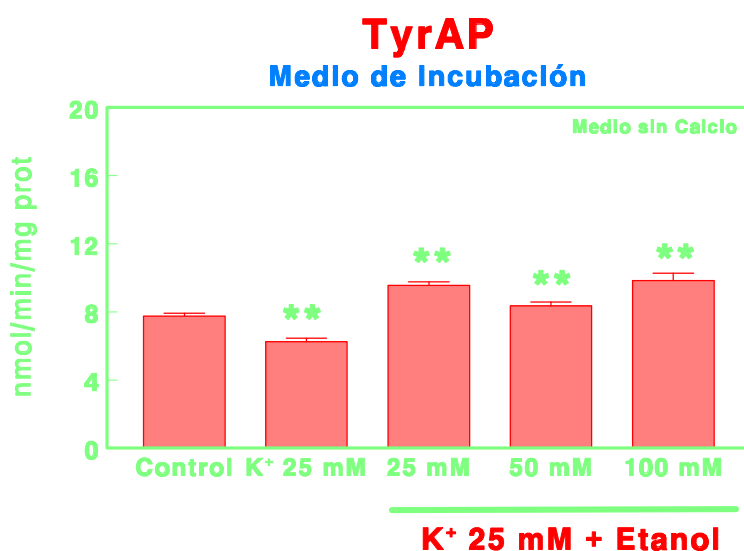
**Figura IV.1.81.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.82.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.83.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.1.84.** Representación del efecto del etanol a concentraciones 25 mM, 50 mM y 100 mM sobre la actividad específica de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratón estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

**2. ESTUDIO *IN VIVO*.**



### **2.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ALCOHOL EN SUERO DE RATÓN TRAS LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL.**

El análisis de los niveles de alcohol en suero de ratones a los que se les administró etanol al 15% en el agua de bebida durante 30 días, mostró como resultado unos valores de  $120.26 \pm 24.415$  mg/dl.

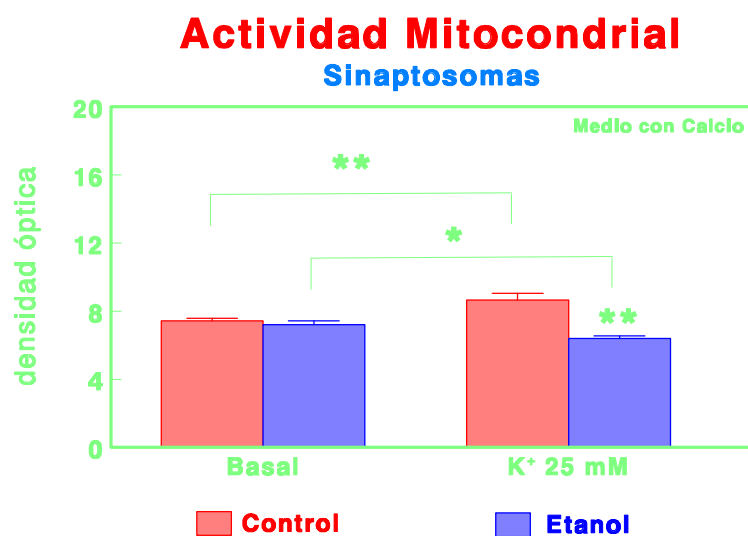
### **2.2. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.1.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad mitocondrial con respecto al control (*figura IV.2.1.*). Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad mitocondrial en un 16.55% con respecto al control (*figura IV.2.2.*).

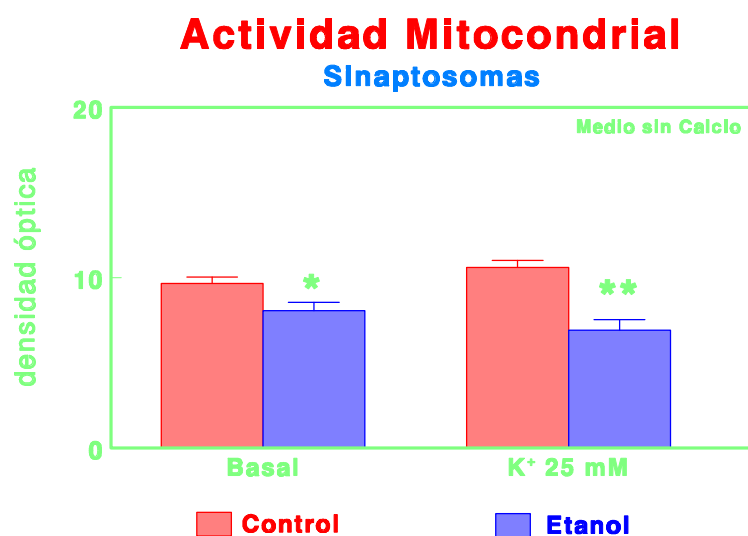
El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.1.*): En presencia de calcio en el medio (*figura IV.2.1.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad mitocondrial del 16.28% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce una disminución de esta actividad del 11.10% ( $p < 0.05$ ), al igual que se produce una inhibición del 25.81% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control. En ausencia de calcio en el medio (*figura IV.2.2.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa alguna de esta actividad, mientras que se produce una inhibición del 34.81% ( $p < 0.05$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control.

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
Control	Basal	7.43±0.151	9.67±0.387
	K <sup>+</sup> 25 mM	8.64±0.414	10.60±0.418
Etanol	Basal	7.22±0.223	8.07±0.498
	K <sup>+</sup> 25 mM	6.41±0.135	6.91±0.641

**Tabla IV.2.1..** Valores de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica. (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.2.1.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles basales de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media $\pm$ SEM; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).



**Figura IV.2.2.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles basales de actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media $\pm$ SEM; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

### **2.3. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales, utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.2.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) en un 59.91% la producción de radicales libres con respecto al control (*figura IV.2.3.*). Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la producción de radicales libres con respecto al control (*figura IV.2.4.*).

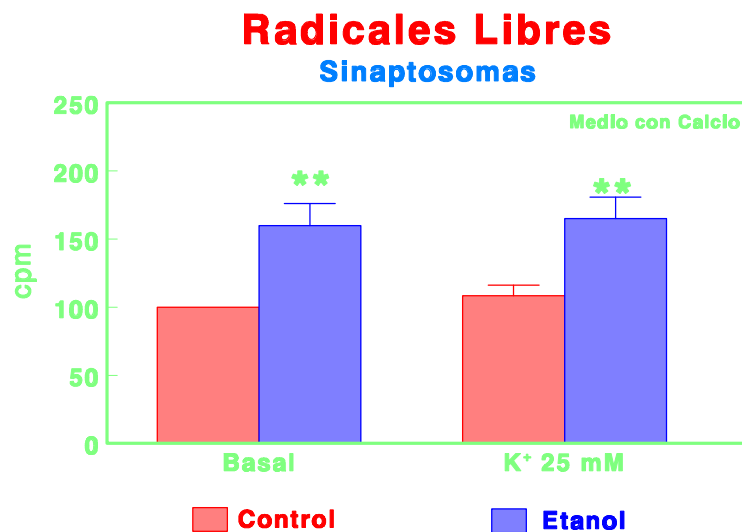
El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.2.*): En presencia de calcio en el medio (*figura 87*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, mientras que se produce un incremento del 52.26% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control. En ausencia de calcio en el medio (*figura 88*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control.

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales, utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.2.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la producción de radicales libres con respecto al control (*figura IV.2.5.*). En ausencia de calcio en el medio, el etanol tampoco modifica significativamente la producción de radicales libres con respecto al control (*figura IV.2.6.*).

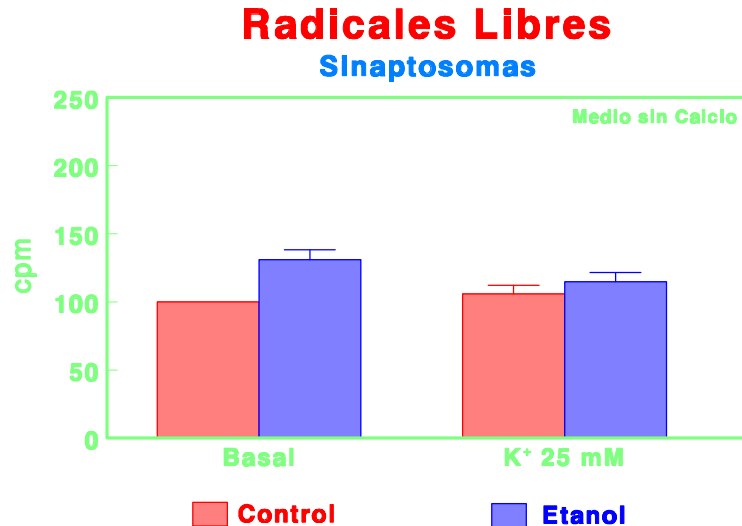
El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la producción de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.2.*): En presencia de calcio en el medio (*figura IV.2.5.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, mientras que se produce un incremento del 49.72% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control. Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio (*figura IV.2.6.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control.

		Sinaptosomas			
		Luminol		Lucigenina	
		Con Calcio	Sin Calcio	Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
	<b><math>K^+</math> 25 mM</b>	108.45±7.63	105.80±6.32	73.41±4.36	81.96±7.53
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	159.91±17.0	130.83±7.38	121.33±11.6	109.47±8.18
	<b><math>K^+</math> 25 mM</b>	165.13±15.6	114.82±6.86	109.91±7.42	100.41±7.60

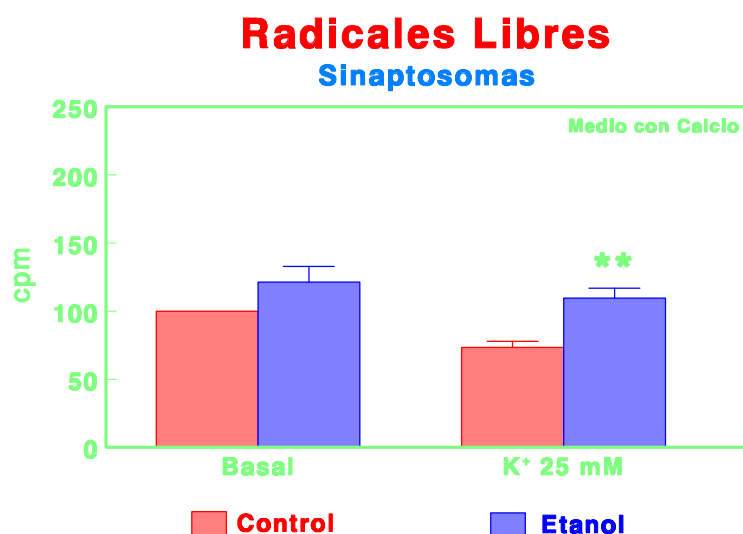
**Tabla IV.2.2.** Valores de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en condiciones basales y tras estimulación con  $K^+$  25mM, en un medio de incubación con o sin calcio y utilizando luminol y lucigenina como potenciadores de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM; n=11).



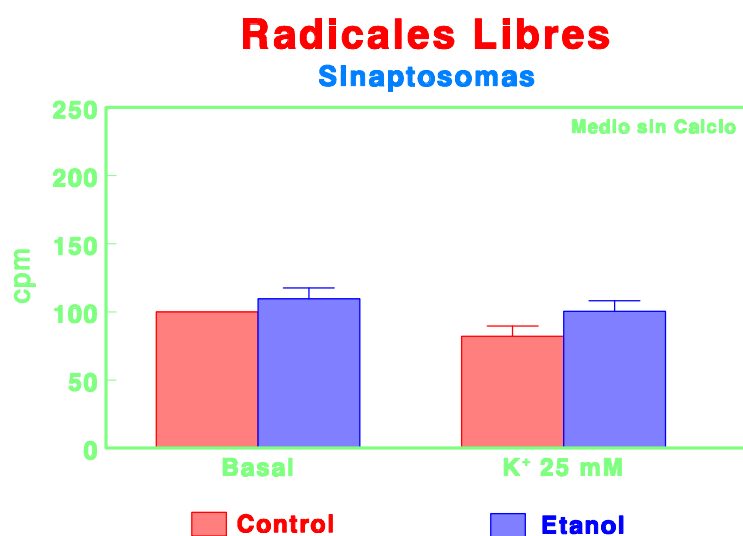
**Figura IV.2.3.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.4.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre los niveles basales de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM).



**Figura IV.2.5.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al valor control ( $Media \pm SEM$ ;  $**p < 0.01$ ).



**Figura IV.2.6.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles de formación de radicales libres de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cpm en porcentaje con respecto al valor control ( $Media \pm SEM$ ).

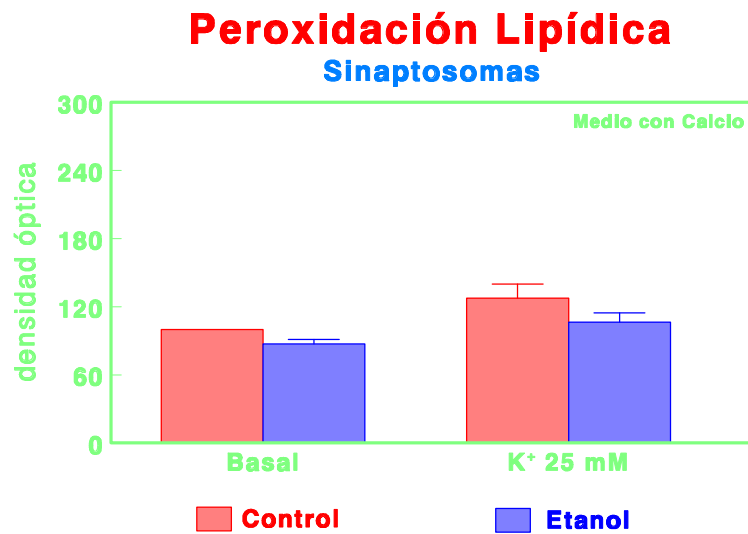
#### **2.4. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE EL NIVEL DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre el nivel de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.3.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente el nivel de peroxidación lipídica con respecto al control (*figura IV.2.7.*). Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio, el etanol aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) el nivel de peroxidación lipídica en un 71.24% con respecto al control (*figura IV.2.8.*).

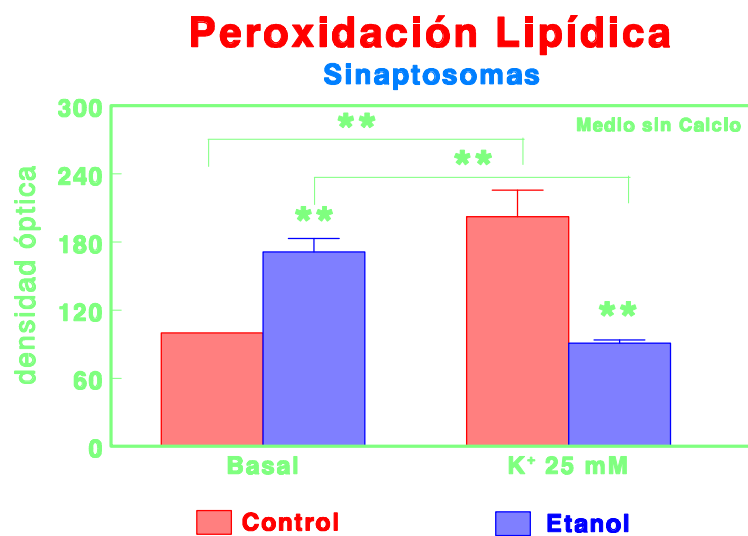
El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre el nivel de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.3.*): En presencia de calcio en el medio (*figura IV.2.7.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control. Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio (*figura IV.2.8.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) del 102.07% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce una disminución de esta actividad del 46.95% ( $p < 0.01$ ), al igual que se produce una inhibición del 53.04% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control.

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	127.50±12.34	202.07±23.49
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	87.30±3.84	171.24±11.86
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	106.51±7.87	90.83±2.70

**Tabla IV.2.3.** Valores de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.2.7.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles basales de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en un medio de incubación con calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ).



**Figura IV.2.8.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre los niveles basales de peroxidación lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en un medio de incubación sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al control ( $Media \pm SEM$ ;  $n=11$ ;  $**p < 0.01$ ).

---

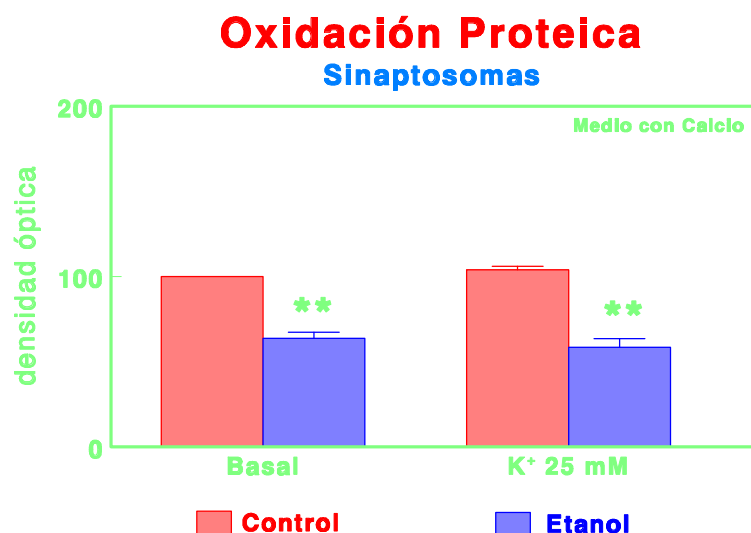
**2.5. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE EL NIVEL DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación, sobre la oxidación de proteínas lipídica de sinaptosomas de corteza frontal de ratón en condiciones basales muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.4.*): En presencia de calcio en el medio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) en un 36.21% la oxidación de proteínas con respecto al control (*figura IV.2.9.*). Por el contrario, en ausencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la oxidación de proteínas con respecto al control (*figura IV.2.10.*).

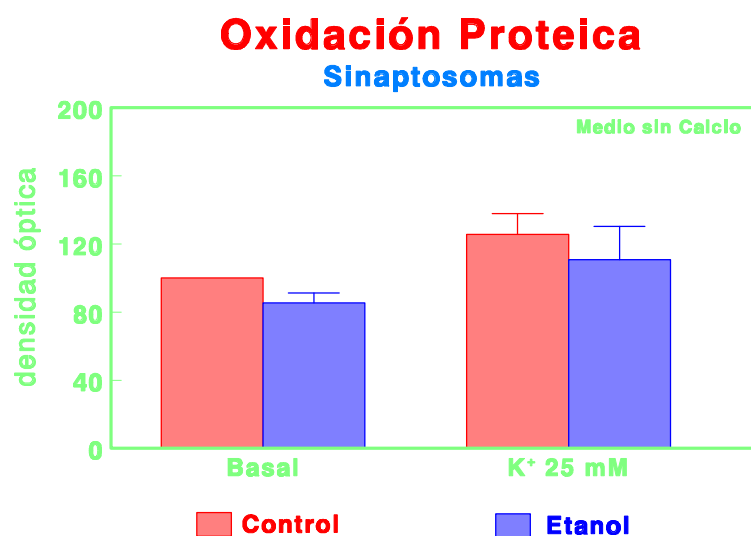
El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia del calcio en el medio de incubación, sobre la oxidación de proteínas de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM muestra los siguientes resultados (*tabla IV.2.4.*): En presencia de calcio en el medio (*figura IV.2.9.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, mientras que se produce una inhibición del 43.74% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control. En ausencia de calcio en el medio (*figura IV.2.10.*), el estímulo de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM no produce modificación significativa alguna con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM del control.

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	100.00±0.00	100.00±0.00
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	104.05±2.17	152.60±12.27
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	63.79±3.53	85.52±5.64
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	58.54±5.09	110.94±19.34

**Tabla IV.2.4.** Valores de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM, en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM; n=11).



**Figura IV.2.9.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre los niveles basales de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.10.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre los niveles de oxidación proteica de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica en porcentaje con respecto al valor control (Media±SEM; n=11).

## **2.6. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ALANINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad específica basal de AlaAP con respecto al control (*tabla IV.2.5., figura IV.2.11.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AlaAP en un 41.93% con respecto al control (*tabla IV.2.5., figura IV.2.12.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AlaAP en un 63.91% (*tabla IV.2.6., figura IV.2.13.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AlaAP en un 26.80% con respecto al control (*tabla IV.2.6., figura IV.2.14.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP del 11.64% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad, mientras que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.2.5., figura IV.2.11.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad AlaAP del 2.27% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce un aumento de esta actividad enzimática del 45.85% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 13.33% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.2.5., figura IV.2.12.*).

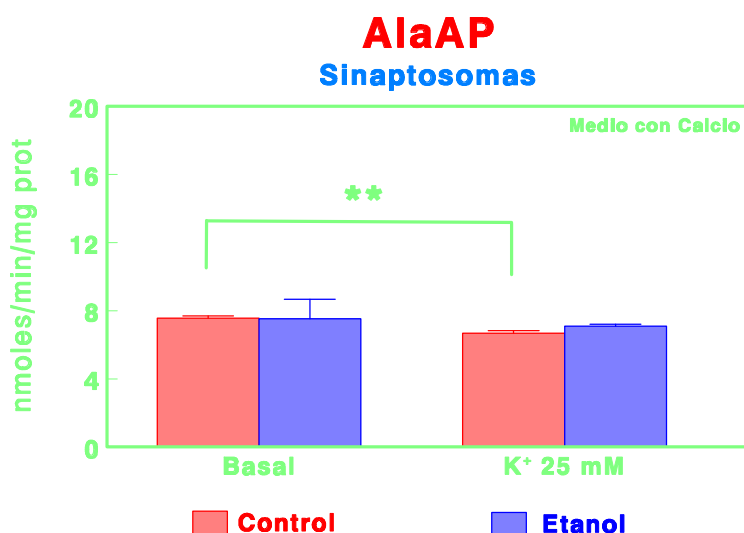
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad AlaAP del 32.10% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 52.56% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 58.31% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.2.6., figura IV.2.13.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad AlaAP con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 30.20% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AlaAP (*tabla IV.2.6., figura IV.2.14.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	7.56±0.131	3.53±0.035
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.68±0.161	3.45±0.027
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	7.53±0.140	2.05±0.041
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	7.10±0.116	2.99±0.073

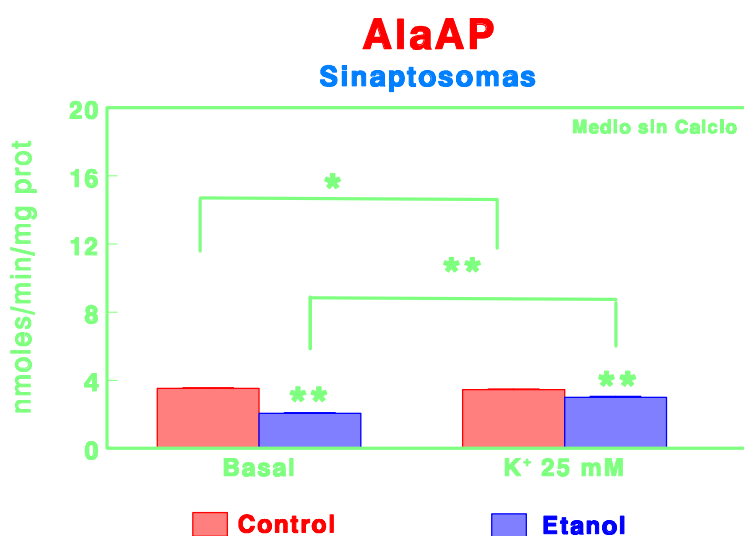
**Tabla IV.2.5.** Valores de actividad específica de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	9.75±0.383	5.00±0.131
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	12.88±0.191	5.00±0.093
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	3.52±0.130	3.66±0.120
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.37±0.173	3.49±0.204

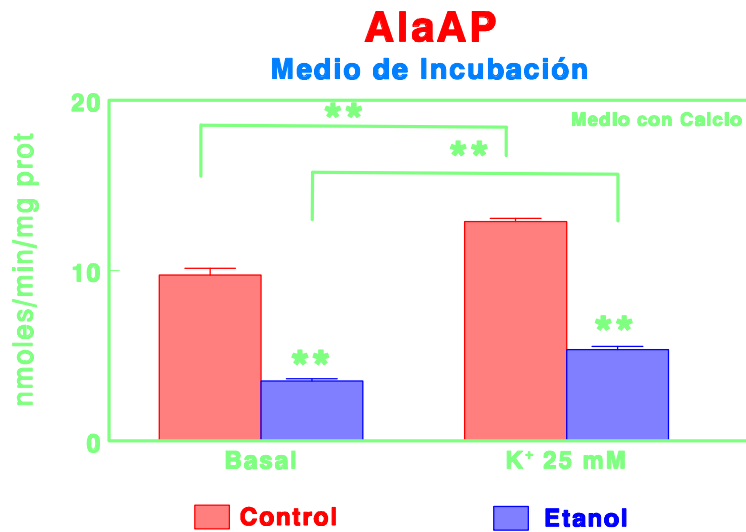
**Tabla IV.2.6.** Valores de actividad específica de AlaAP en medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



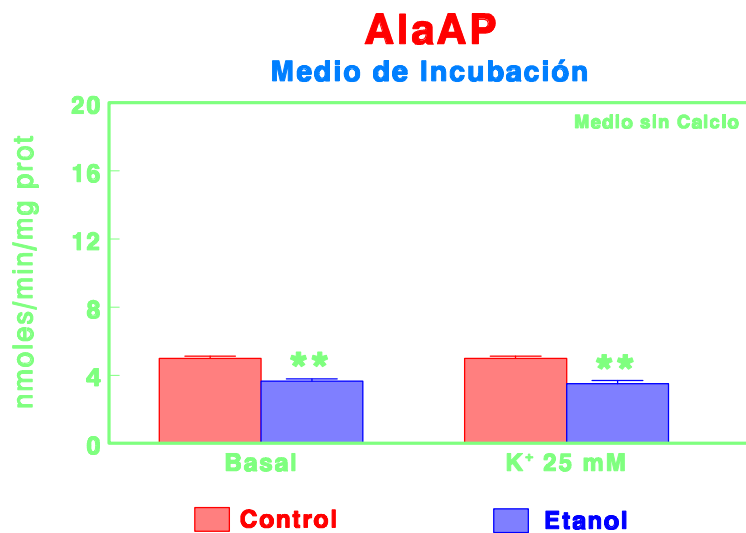
**Figura IV.2.11.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.12.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.13.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.14.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de AlaAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Ala-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).

---

**2.7. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ARGININA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de ArgAP en un 36.42% con respecto al control (*tabla IV.2.7., figura IV.2.15.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de ArgAP en un 41.13% con respecto al control (*tabla IV.2.7., figura IV.2.16.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de ArgAP en un 65.91% (*tabla IV.2.8., figura IV.2.17.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de ArgAP en un 53.10% con respecto al control (*tabla IV.2.8., figura IV.2.18.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad ArgAP con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad, mientras que se produce una inhibición del 32.76% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.2.7., figura IV.2.15.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP del 11.32% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 67.95% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 11.19% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.2.7., figura IV.2.16.*).

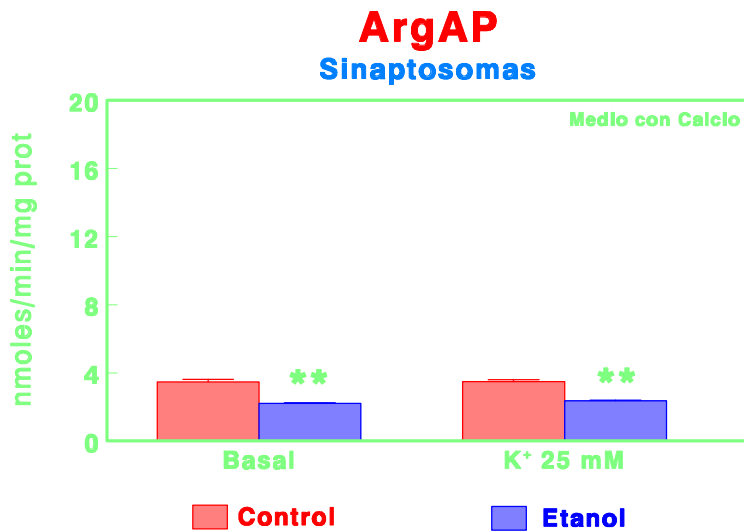
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP del 48.93% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 28.41% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 70.61% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.2.8., figura IV.2.17.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad ArgAP del 27.59% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 40.32% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de ArgAP (*tabla IV.2.8., figura IV.2.18.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	3.46±0.150	2.65±0.060
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.48±0.110	2.95±0.047
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	2.20±0.029	1.56±0.066
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	2.34±0.062	2.62±0.090

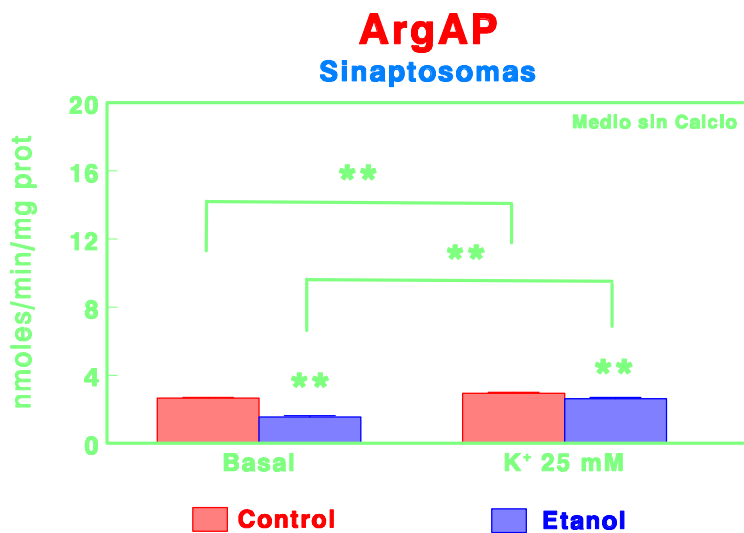
**Tabla IV.2.7.** Valores de actividad específica de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Arg-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	7.95±0.135	4.35±0.135
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	11.84±0.276	3.15±0.150
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	2.71±0.081	2.04±0.070
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.48±0.063	1.88±0.112

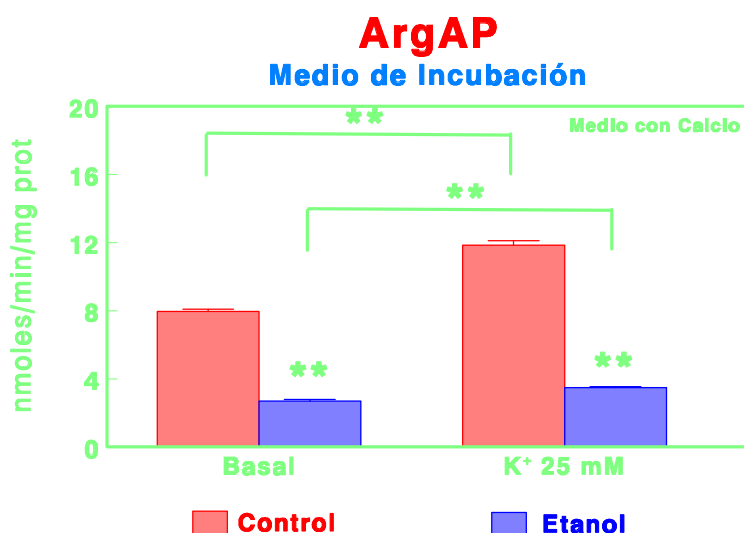
**Tabla IV.2.8.** Valores de actividad específica de ArgAP en medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Arg-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



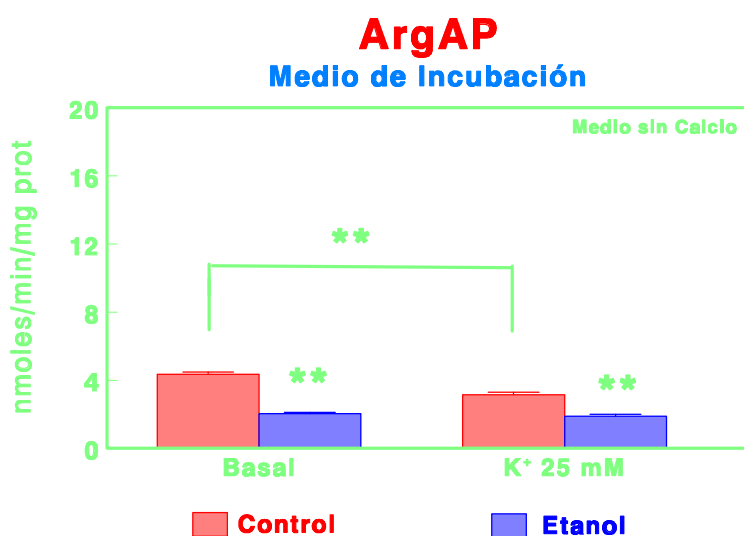
**Figura IV.2.15.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.16.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.17.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.18.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de ArgAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Arg- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

## **2.8. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE CISTEÍNA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de CysAP en un 32.19% con respecto al control (*tabla IV.2.9., figura IV.2.19.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de CysAP en un 37.98% con respecto al control (*tabla IV.2.9., figura IV.2.20.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de CysAP en un 54.30% (*tabla IV.2.10., figura IV.2.21.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de CysAP en un 45.39% con respecto al control (*tabla IV.2.10., figura IV.2.22.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad CysAP con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol produce un aumento de esta actividad enzimática del 22.22% ( $p < 0.05$ ), mientras que se produce una inhibición del 24.38% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.2.9., figura IV.2.19.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP del 55.35% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce un aumento de esta actividad enzimática del 127.69% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 9.10% ( $p < 0.05$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.2.9., figura IV.2.20.*).

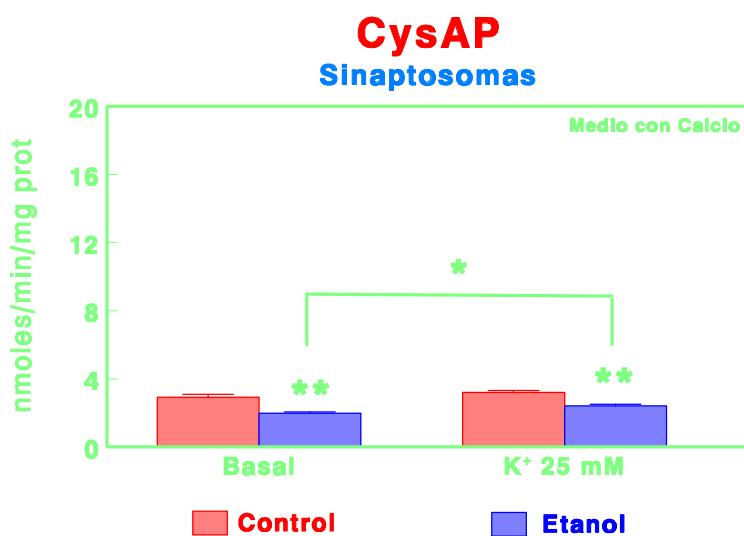
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP del 53.31% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 27.17% ( $p < 0.05$ ), mientras que se produce una inhibición del 62.10% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.2.10., figura IV.2.21.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad CysAP del 34.31% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce una disminución de esta actividad enzimática del 23.29% ( $p < 0.05$ ), mientras que se produce una inhibición del 36.23% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de CysAP (*tabla IV.2.10., figura IV.2.22.*).

		<b>Sinaptosomas</b>	
		<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	2.92±0.168	4.95±0.179
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.20±0.115	7.69±0.242
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	1.98±0.082	3.07±0.105
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	2.42±0.081	6.99±0.303

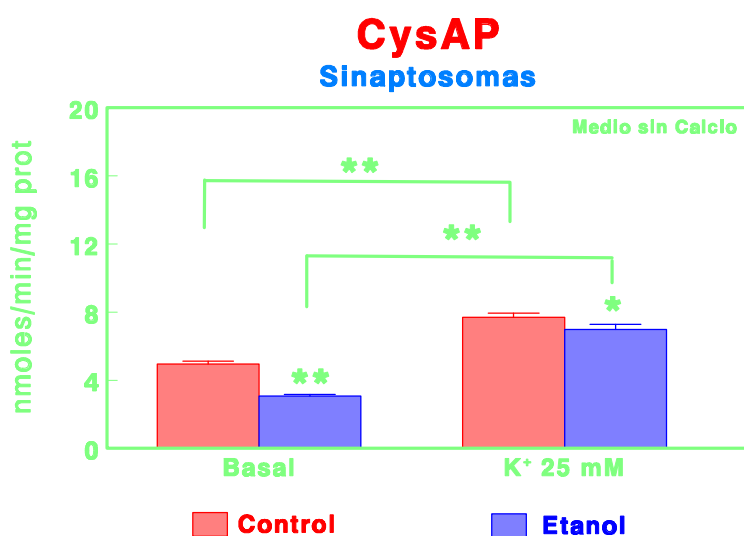
**Tabla IV.2.9.** Valores de actividad específica de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		<b>Medio de Incubación</b>	
		<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	6.04±0.119	8.57±0.339
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	9.26±0.384	5.63±0.300
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	2.76±0.083	4.68±0.264
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.51±0.086	3.59±0.241

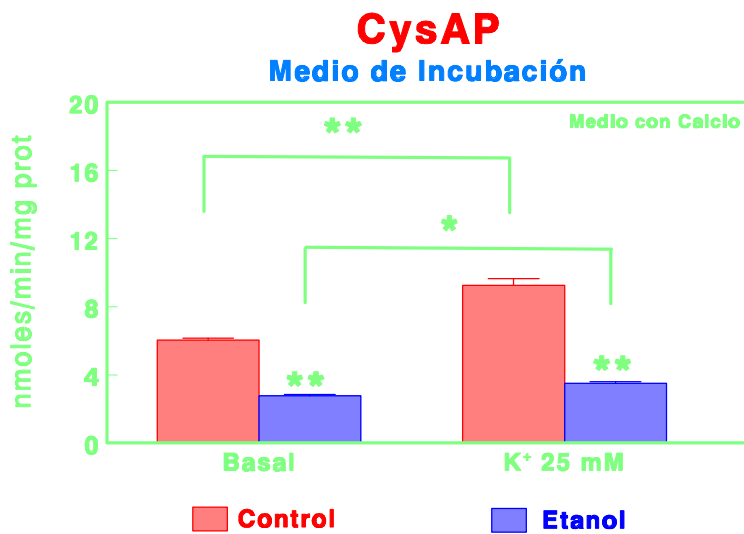
**Tabla IV.2.10.** Valores de actividad específica de CysAP en medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



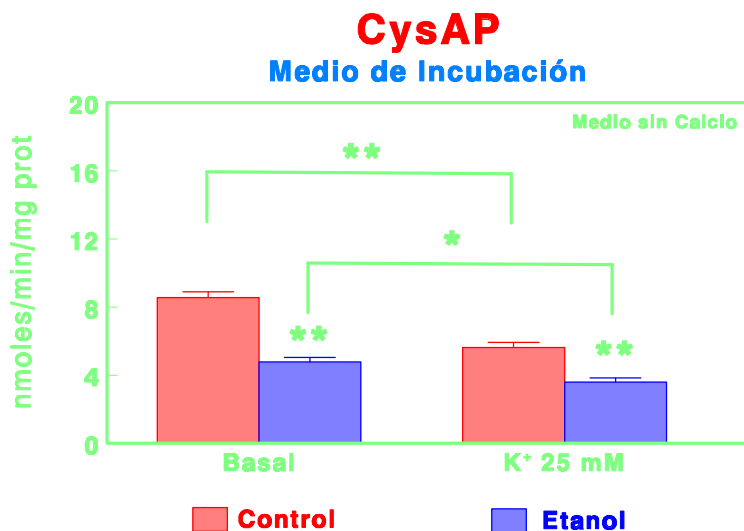
**Figura IV.2.19.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM;  $n=11$ ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ ).



**Figura IV.2.20.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de CysAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM;  $n=11$ ; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ).



**Figura IV.2.21.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de CysAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.22.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de CysAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Cys-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05; \*\*p<0.01).

---

**2.9. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ASPARTATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad específica basal de AspAP con respecto al control (*tabla IV.2.11., figura IV.2.23.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AspAP en un 42.05% con respecto al control (*tabla IV.2.11., figura IV.2.24.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AspAP en un 61.11% (*tabla IV.2.12., figura IV.2.25.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de AspAP en un 49.12% con respecto al control (*tabla IV.2.12., figura IV.2.26.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad AspAP del 17.41% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 16.86% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AspAP (*tabla IV.2.11., figura IV.2.23.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad AspAP del 63.62% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 180.76% ( $p < 0.01$ ), mientras que no se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AspAP (*tabla IV.2.11., figura IV.2.24.*).

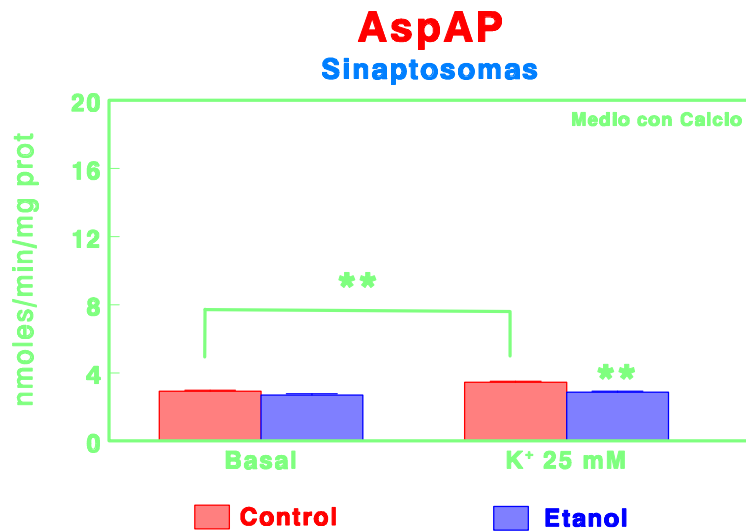
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad AspAP del 47.18% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 39.07% ( $p < 0.05$ ), mientras que se produce una inhibición del 63.25% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AspAP (*tabla IV.2.12., figura IV.2.25.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad AspAP del 36.78% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce una disminución de esta actividad enzimática del 34.63% ( $p < 0.05$ ), al igual que se produce una inhibición del 47.39% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de AspAP (*tabla IV.2.12., figura IV.2.26.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	2.93±0.049	5.47±0.126
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.44±0.073	8.95±0.230
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	2.69±0.073	3.17±0.104
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	2.86±0.051	8.90±0.317

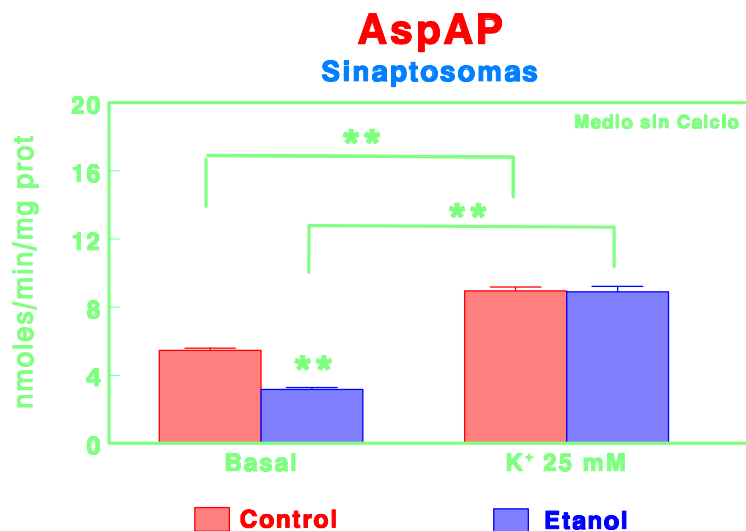
**Tabla IV.2.11.** Valores de actividad específica de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	9.41±0.360	4.54±0.190
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	13.85±0.415	2.87±0.174
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	3.66±0.162	2.31±0.201
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.09±0.060	1.51±0.215

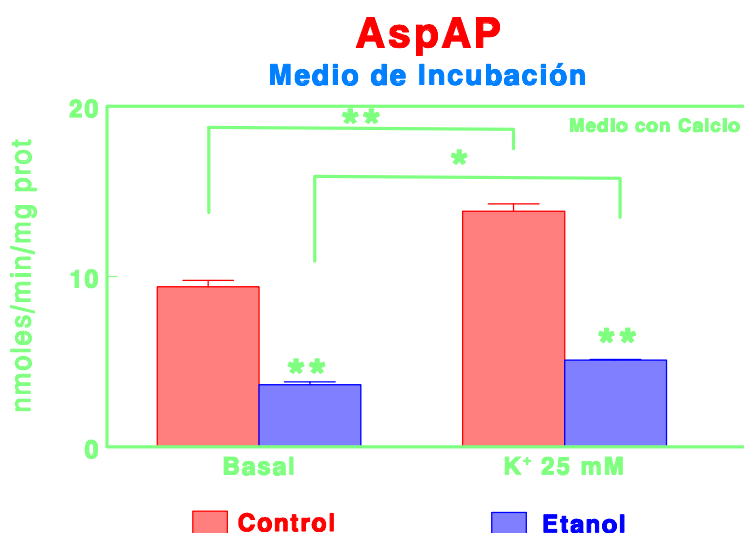
**Tabla IV.2.12.** Valores de actividad específica de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Asp-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



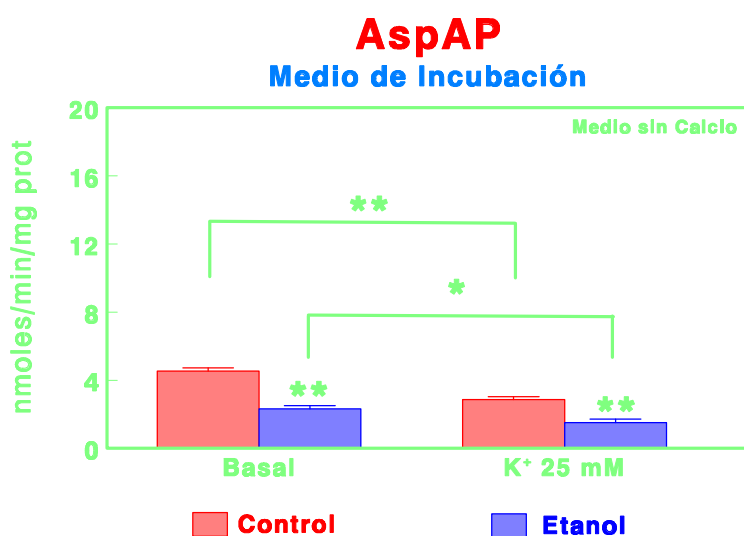
**Figura IV.2.23.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.24.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de AspAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.25.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).



**Figura IV.2.26.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de AspAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Asp- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).

## **2.10. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE GLUTAMATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad específica basal de GluAP con respecto al control (*tabla IV.2.13., figura IV.2.27.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de GluAP en un 27.04% con respecto al control (*tabla IV.2.13., figura IV.2.28.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de GluAP en un 46.12% (*tabla IV.2.14., figura IV.2.29.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de GluAP en un 135.76% con respecto al control (*tabla IV.2.14., figura IV.2.30.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP del 20.24% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 11.46% ( $p < 0.05$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.2.13., figura IV.2.27.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP del 55.48% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 113.74% ( $p < 0.01$ ), mientras que no se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.2.13., figura IV.2.28.*).

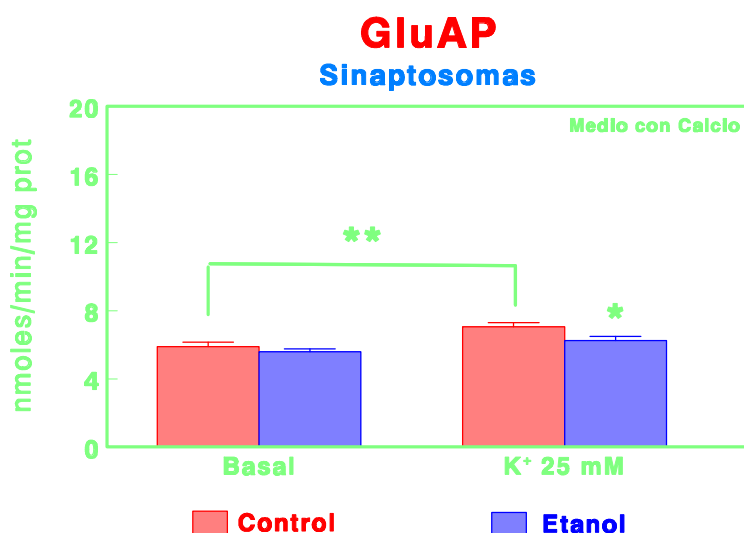
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP del 34.09% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 50.65% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.2.14., figura IV.2.29.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad GluAP del 41.82% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce una disminución de esta actividad enzimática del 25.84% ( $p < 0.01$ ), mientras que no se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de GluAP (*tabla IV.2.14., figura IV.2.30.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	5.88±0.280	4.29±0.118
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	7.07±0.231	6.67±0.260
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	5.60±0.152	3.13±0.074
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.26±0.237	6.69±0.181

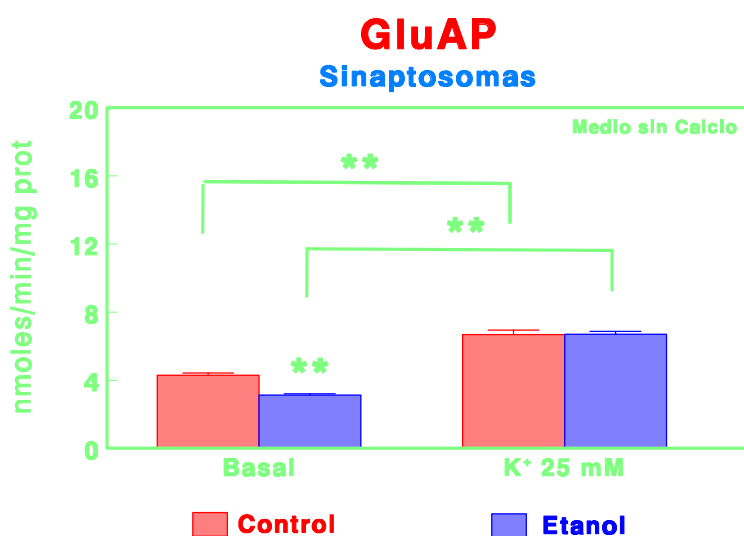
**Tabla IV.2.13.** Valores de actividad específica de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	3.99±0.243	6.60±0.359
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.35±0.661	9.36±0.501
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	2.15±0.076	15.56±0.695
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	2.64±0.048	11.54±0.464

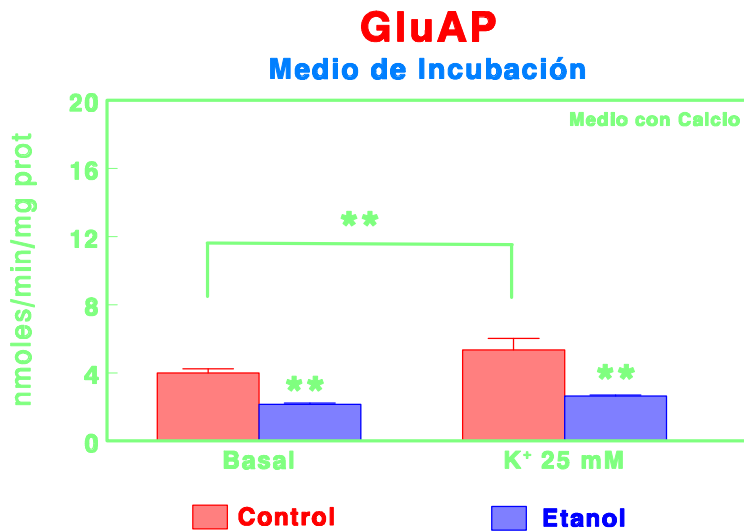
**Tabla IV.2.14.** Valores de actividad específica de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



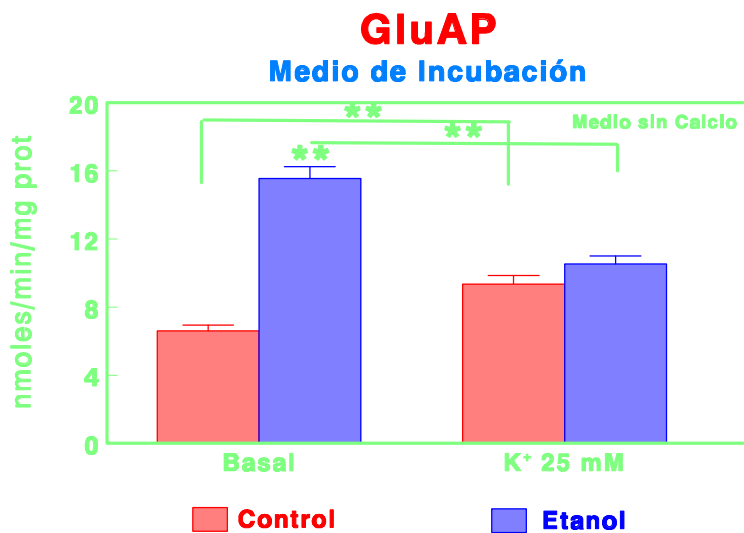
**Figura IV.2.27.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.28.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de GluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.29.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.30.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de GluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Glu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

---

**2.11. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad específica basal de pGluAP con respecto al control (*tabla IV.2.15., figura IV.2.31.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de pGluAP en un 21.63% con respecto al control (*tabla IV.2.15., figura IV.2.32.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de pGluAP en un 35.24% (*tabla IV.2.16., figura IV.2.33.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de pGluAP en un 24.21% con respecto al control (*tabla IV.2.16., figura IV.2.34.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad pGluAP con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol se produce un aumento de esta actividad enzimática del 25.21% ( $p < 0.01$ ), mientras que no se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.2.15., figura IV.2.31.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad pGluAP del 87.21% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 109.50% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 12.30% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.2.15., figura IV.2.32.*).

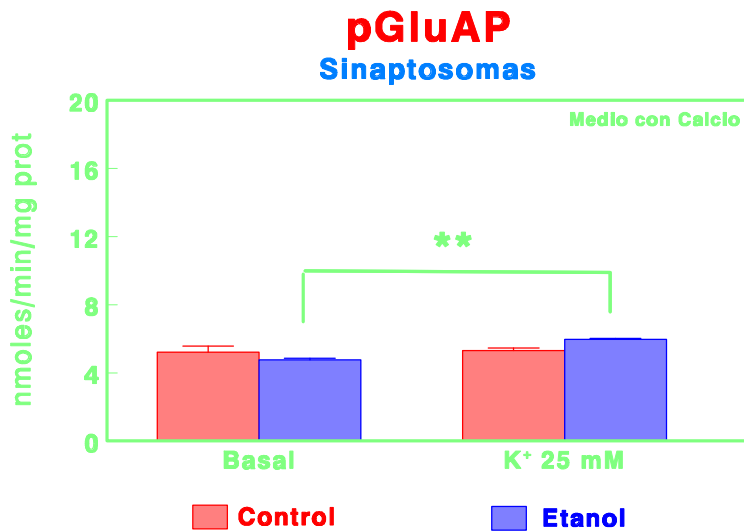
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad pGluAP del 75.58% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática en un 33.11% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 50.91% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.2.16., figura IV.2.33.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad pGluAP del 38.29% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce una disminución de esta actividad enzimática del 29.58% ( $p < 0.01$ ), mientras que no se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de pGluAP (*tabla IV.2.16., figura IV.2.34.*).

		<b>Sinaptosomas</b>	
		<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	5.21±0.348	4.30±0.105
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.30±0.150	8.05±0.233
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	4.76±0.087	3.37±0.058
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	5.96±0.068	7.06±0.235

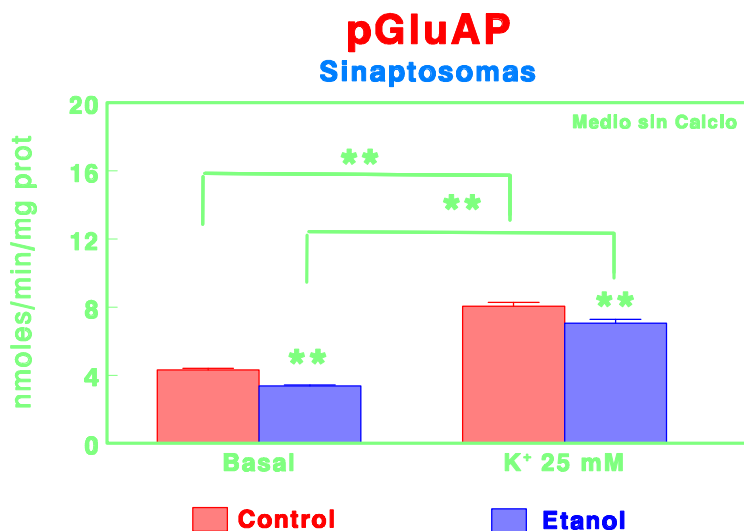
**Tabla IV.2.15.** Valores de actividad específica de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		<b>Medio de Incubación</b>	
		<b>Con Calcio</b>	<b>Sin Calcio</b>
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	4.71±0.199	5.04±0.202
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	8.27±0.468	3.11±0.119
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	3.05±0.121	3.82±0.098
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	4.06±0.133	2.69±0.084

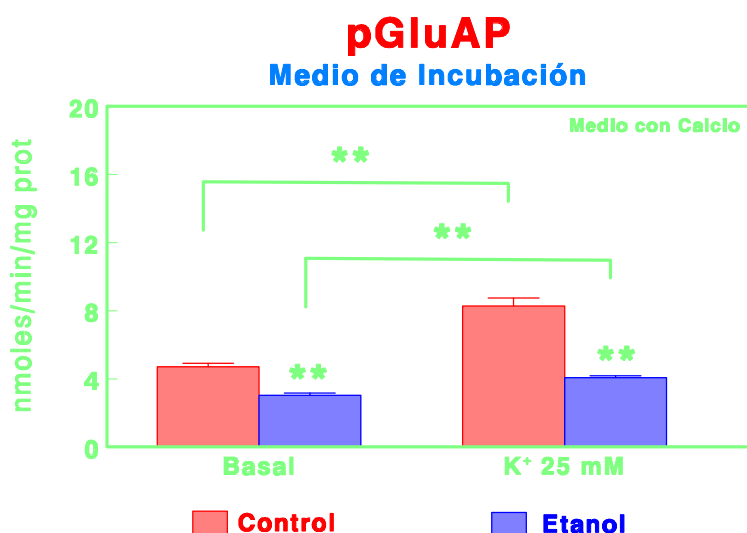
**Tabla IV.2.16.** Valores de actividad específica de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



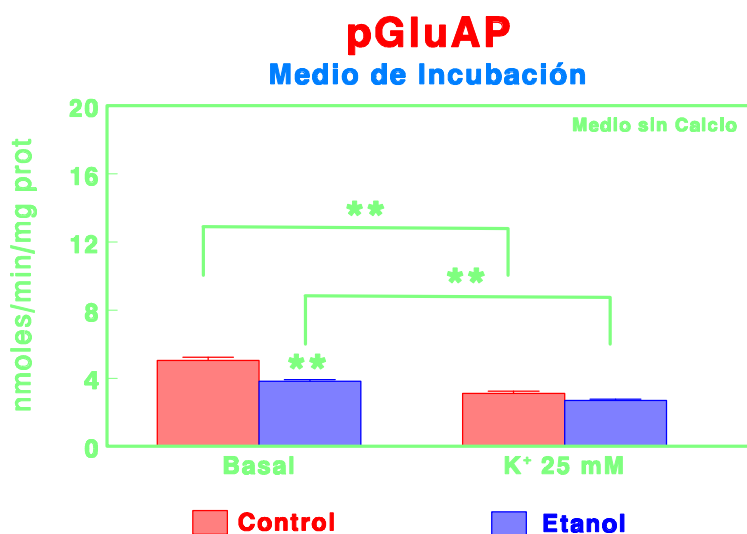
**Figura IV.2.31.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.32.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.33.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.34.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de pGluAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de pGlu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\*p<0.01).

## **2.12. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LEUCINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol no modifica significativamente la actividad específica basal de GluAP con respecto al control (*tabla IV.2.17., figura IV.2.35.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de LeuAP en un 41.82% con respecto al control (*tabla IV.2.17., figura IV.2.36.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de LeuAP en un 66.53% (*tabla IV.2.18., figura IV.2.37.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de LeuAP en un 46.83% con respecto al control (*tabla IV.2.18., figura IV.2.38.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM no provoca modificación significativa alguna de la actividad LeuAP con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol tampoco se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.2.17., figura IV.2.35.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la actividad LeuAP del 5.32% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 58.90% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 12.22% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.2.17., figura IV.2.36.*).

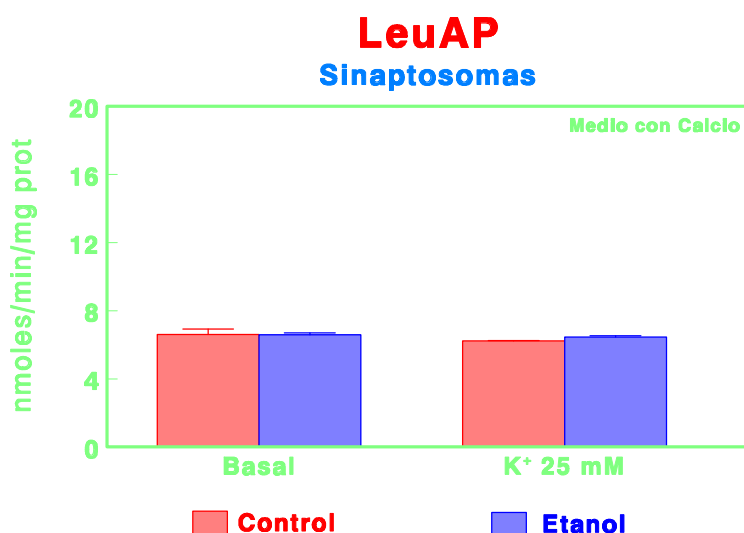
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP del 35.88% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática en un 46.88% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 63.82% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.2.18., figura IV.2.37.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad LeuAP del 20.41% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 28.91% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de LeuAP (*tabla IV.2.18., figura IV.2.38.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	6.60±0.321	10.33±0.197
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.23±0.029	10.88±0.156
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	6.58±0.112	6.01±0.059
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.45±0.081	9.55±0.186

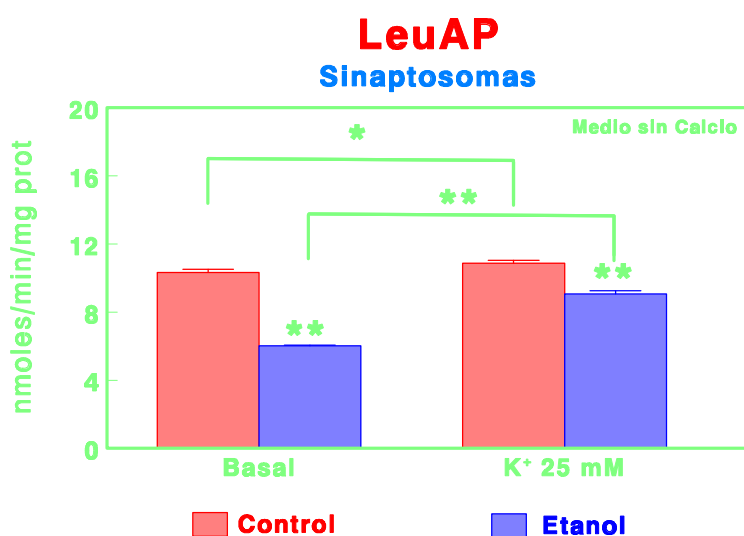
**Tabla IV.2.17.** Valores de actividad específica de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	9.56±0.189	12.3±0.455
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	12.99±0.088	9.79±0.316
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	3.20±0.171	6.54±0.239
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	4.70±0.113	6.96±0.638

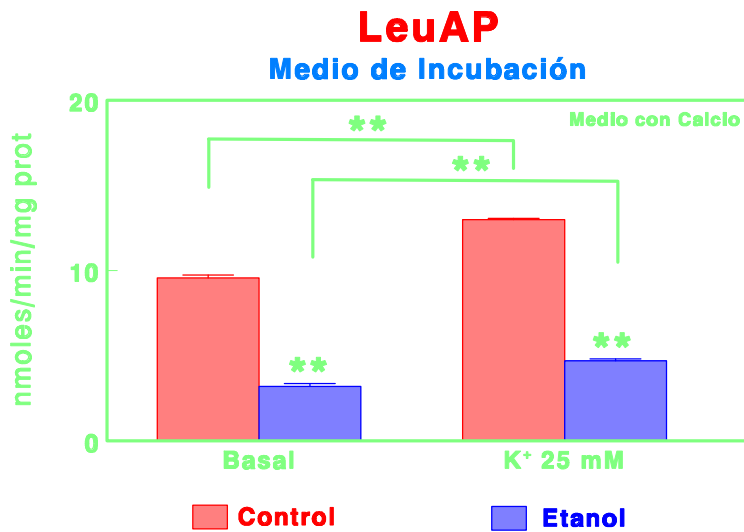
**Tabla IV.2.18.** Valores de actividad específica de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).



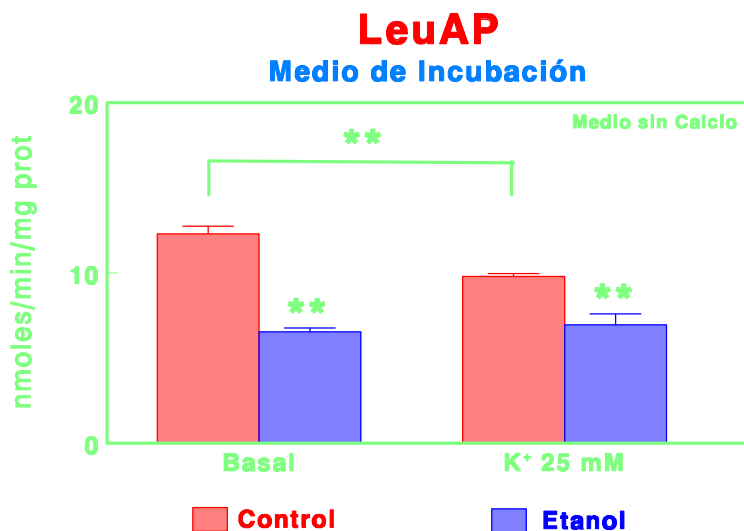
**Figura IV.2.35.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11).



**Figura IV.2.36.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.37.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).



**Figura IV.2.38.** Representación del efecto del estímulo con K<sup>+</sup> 25 mM sobre la actividad específica basal de LeuAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Leu-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11; \*\*p<0.01).

---

**2.13. EFECTO DE LA INGESTA CRÓNICA DE ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE TIROSINA AMINOPEPTIDASA DE SINAPTOSOMAS DE CORTEZA FRONTAL DE RATÓN, EN CONDICIONES BASALES Y DESPOLARIZANTES. INFLUENCIA DEL CALCIO.**

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol, en presencia o ausencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio en el medio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad específica basal de GluAP en un 12.20% con respecto al control (*tabla IV.2.19., figura IV.2.39.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de TyrAP en un 43.86% con respecto al control (*tabla IV.2.19., figura IV.2.40.*).

En el medio de incubación y en presencia de calcio, el etanol disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de TyrAP en un 42.69% (*tabla IV.2.20., figura IV.2.41.*). En ausencia de calcio, el etanol también disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) la actividad específica basal de TyrAP en un 49.61% con respecto al control (*tabla IV.2.20., figura IV.2.42.*).

El análisis de los efectos de la ingesta crónica de etanol y la influencia de calcio en el medio, sobre la actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratón y su medio de incubación, tras la estimulación con  $K^+$  25 mM, muestra los siguientes resultados: En sinaptosomas y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad TyrAP del 14.06% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, al igual que tampoco se produce modificación significativa alguna de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.2.19., figura IV.2.39.*). Por el contrario, en ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP del 14.08% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática del 70.10% ( $p < 0.01$ ), mientras que se produce una inhibición del 16.30% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.2.19., figura IV.2.40.*).

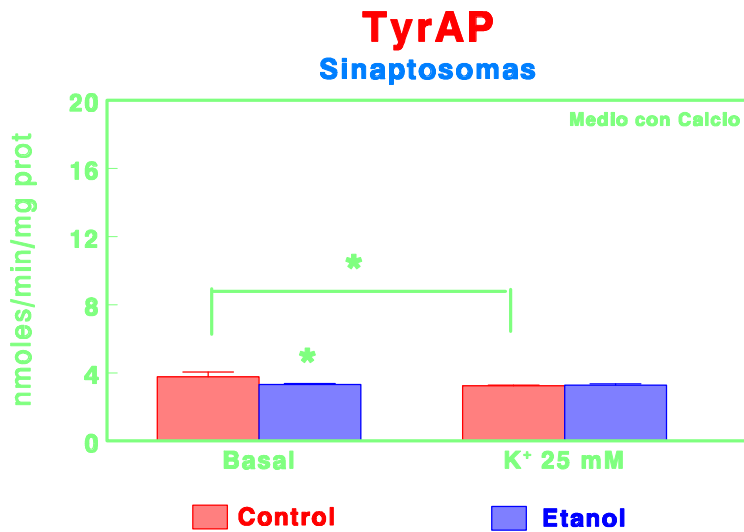
En el medio de incubación y en presencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP del 27.85% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol también se produce un aumento de esta actividad enzimática en un 25.14% ( $p < 0.05$ ), mientras que se produce una inhibición del 43.91% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.2.20., figura IV.2.41.*). En ausencia de calcio, el estímulo con  $K^+$  25 mM provoca una inhibición significativa ( $p < 0.01$ ) de la actividad TyrAP del 24.74% con respecto al control, en esta misma situación y tras la ingesta crónica de etanol no se produce modificación significativa de esta actividad enzimática, mientras que se produce una inhibición del 46.92% ( $p < 0.01$ ) de los niveles obtenidos con la estimulación con  $K^+$  25 mM tras la ingesta crónica de etanol con respecto a los niveles obtenidos tras la estimulación con  $K^+$  25 mM de la actividad específica basal de TyrAP (*tabla IV.2.20., figura IV.2.42.*).

		Sinaptosomas	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	3.77±0.272	5.54±0.096
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.24±0.123	6.32±0.123
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	3.31±0.061	3.11±0.175
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	3.28±0.064	5.29±0.112

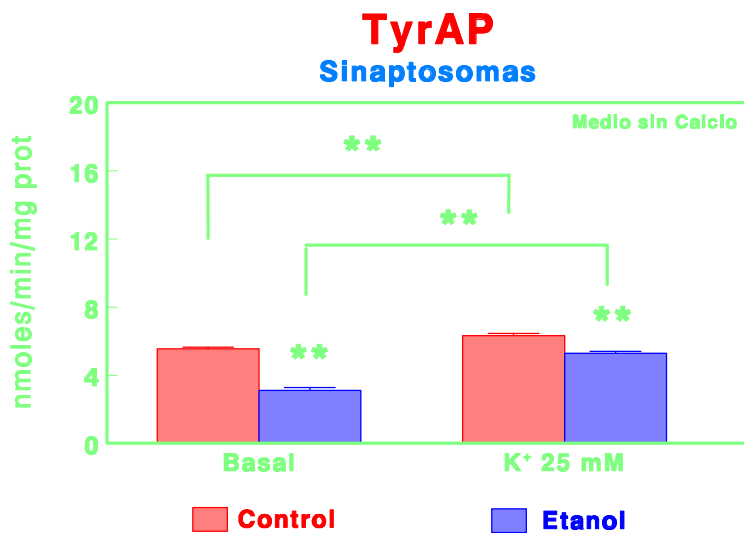
**Tabla IV.2.19.** Valores de actividad específica de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11).

		Medio de Incubación	
		Con Calcio	Sin Calcio
<b>Control</b>	<b>Basal</b>	9.37±0.312	7.76±0.134
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	11.98±0.242	5.84±0.705
<b>Etanol</b>	<b>Basal</b>	5.37±0.293	3.91±0.184
	<b>K<sup>+</sup> 25 mM</b>	6.72±0.130	3.10±0.288

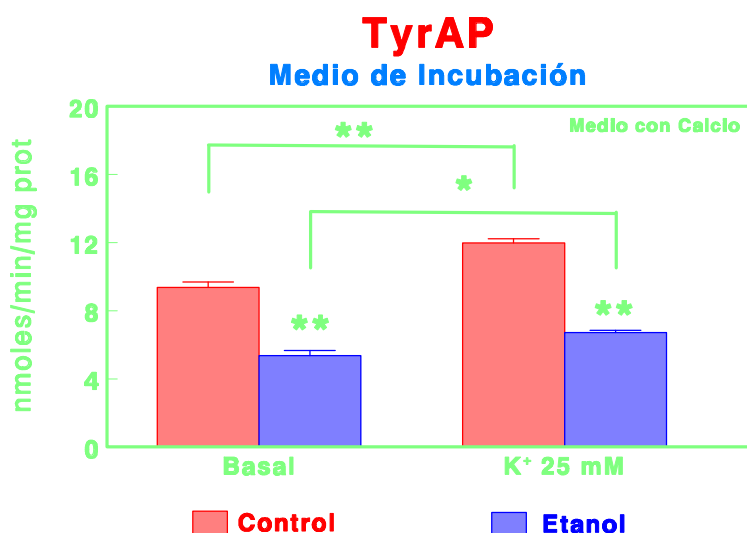
**Tabla IV.2.20.** Valores de actividad específica de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida en condiciones basales y tras estimulación con K<sup>+</sup> 25 mM en un medio de incubación con o sin calcio. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr-β-naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media±SEM; n=11)



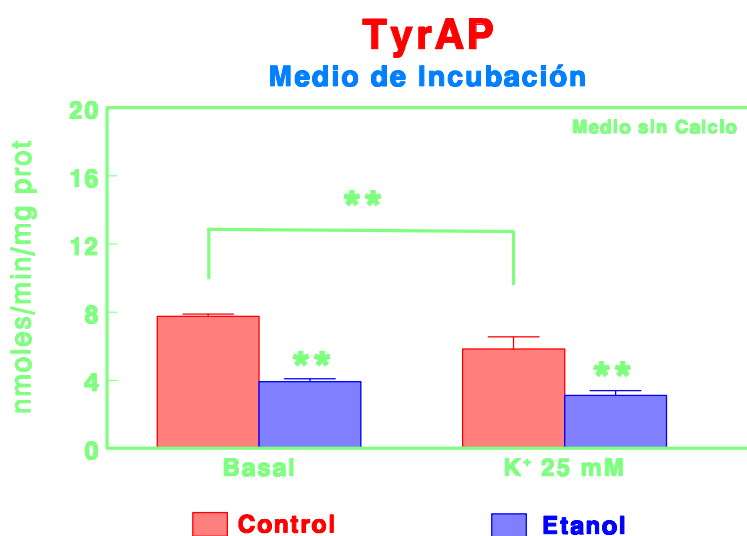
**Figura IV.2.39.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \* $p$ <0.05).



**Figura IV.2.40.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\* $p$ <0.01).



**Figura IV.2.41.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en presencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).



**Figura IV.2.42.** Representación del efecto del estímulo con  $K^+$  25 mM sobre la actividad específica basal de TyrAP en el medio de incubación de sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron etanol en el agua de bebida, incubados en ausencia de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en nmoles de Tyr- $\beta$ -naftilamida hidrolizados por minuto y por mg de proteína (Media $\pm$ SEM; n=11; \*\* $p$ <0.01).



**V.**

**DISCUSIÓN.**



## 1. SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.

### 1.1. SOBRE LA FRACCIÓN SINAPTOSOMAL UTILIZADA.

La pureza de las fracciones estándar de sinaptosomas ha sido puesta en tela de juicio muchas veces. Por ejemplo, estudios en los que se añaden homogeneizados de células gliales cultivadas marcadas con radionucleótidos a homogeneizados de cerebro antes del comienzo del fraccionamiento subcelular, indican que la mitad del material de las fracciones sinaptosomales puede derivarse de las células gliales en lugar de los terminales nerviosos (Henn *et al.*, 1976). Con estos trabajos, se pone en duda la significación de estudios que utilizan preparados de sinaptosomas para investigar las propiedades de los terminales nerviosos de los que se supone que derivan. Pero también existen muchas pruebas a favor de que los sinaptosomas comprenden la mayoría de los cuerpos citoplasmáticos presentes en estas fracciones (Lajtha, 1983).

Debido a que los métodos habituales para preparar fracciones de sinaptosomas son sencillos (ultracentrifugación en gradiente de densidad discontinua), a priori, parecería que las fracciones de sinaptosomas fuesen muy homogéneas y estuviesen libres de material contaminante. Sin embargo, una amplia gama de fragmentos de membrana de distinto tamaño contamina las preparaciones de sinaptosomas, tal como se desprende de la mayor parte de las imágenes de microscopio electrónico publicadas sobre estas fracciones. Muchos perfiles de membrana sacciformes no contienen estructuras características de las sinapsis, como engrosamientos sinápticos o vesículas sinápticas. No obstante, la ausencia de vesículas sinápticas especializadas puede deberse frecuentemente al plano del corte de estas estructuras; los cortes de microscopía electrónica habitualmente tienen un grosor de 50 nm mientras que los terminales nerviosos son mucho mayores (1-2  $\mu\text{m}$ ) en diámetro y parecen contener regiones no ocupadas por vesículas o mitocondrias. Las estructuras sacciformes vacías de este tipo contienen frecuentemente material granular que podría ser citoplasma y estas estructuras podrían formarse a partir de prolongaciones gliales arrancadas (gliosomas) (Cotman y Taylor, 1971; Gambetti *et al.*, 1972) o de las dendritas (dendrosomas). La presencia de polisomas es un hecho

raro y cuando existen es probable que sea debido a que estos no se han observado en los axones de los terminales nerviosos, pero existen en las dendritas y en las prolongaciones gliales. Otras estructuras que se aprecian frecuentemente en los preparados del cerebro son los sinaptosomas unidos a un saco de una dendrita postsináptica (Verity *et al.*, 1980). Estas estructuras mixtas pre- y postsinápticas son poco frecuentes, no se sabe si la región postsináptica consta de un cuerpo citoplásmico cerrado (Bradford, 1988).

La fracción subcelular equivalente preparada a partir de células gliales cultivadas, que correspondería a la fracción sinaptosomal, parece ser totalmente distinta desde el punto de vista morfológico y consta esencialmente de perfiles membranosos vacíos. Estudios con marcadores químicos y enzimáticos de las células gliales han sugerido una contribución relativamente mínima desde las células gliales (Delaunoy *et al.*, 1979; Wheler *et al.*, 1979; Ward y Bradford, 1979). Otros estudios, basándose en los sistemas de transporte específicos de la membrana (Bradford, 1988), han demostrado que hay al menos una proporción 5:1 de sinaptosomas o dendrosomas con respecto a gliosomas en los preparados de la corteza cerebral. Puesto que una elevada proporción de la superficie de las arborizaciones dendríticas parece ofrecer lugares para los botones sinápticos que realizan contacto, se cree improbable que la fragmentación durante la dispersión tisular (homogeneización) permita la formación de dendrosomas. Las membranas plasmáticas de las dendritas y las espinas dendríticas se fragmentan para formar membranas libres o parte de los sinaptosomas durante la disrupción tisular (Bradford, 1988).

Estas líneas de argumentación y los datos a que han dado lugar sugieren que los preparados estándar, ricos en sinaptosomas, contienen una contaminación relativamente pequeña (< 20%) en forma de elementos gliales citoplasmáticos, aunque pueda parecer sorprendente que con la simplicidad del método de preparación se consigan estos porcentajes (Bradford, 1988).

## **1.2. SOBRE EL ENSAYO CON MTT COMO ÍNDICE DEL COMPORTAMIENTO BIOENERGÉTICO DE LOS SINAPTOSOMAS.**

En 1983, Mosmann utilizó la sal MTT para desarrollar un método cuantitativo colorimétrico para determinar la supervivencia y proliferación de células de mamíferos. El ensayo está basado en la hidrólisis de esta sal tetrazólica (de color amarillo) por el enzima mitocondrial succinato-dehidrogenasa, formando cristales insolubles en agua de color azul oscuro (Slater *et al.*, 1963). Este ensayo detecta células vivas, pero no muertas, y la señal generada depende del grado de activación de las células. Este método ha sido muy utilizado para medir la proliferación celular y la citotoxicidad (Martínez-Martos *et al.*, 2000). Debido al uso tan extendido de los

sinaptosomas para estudiar diversos aspectos farmacológicos, fisiológicos y bioquímicos de la función sináptica, en nuestro laboratorio se ha analizado la utilidad del ensayo con MTT para estudiar la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial bajo condiciones basales y estimuladas, en sinaptosomas de corteza cerebral de ratones y ratas para proponerlo como un índice de la funcionabilidad y el estado energético de esta fracción subcelular. Nuestros resultados demuestran que el ensayo con MTT es útil para analizar los cambios fisiológicos en el estado energético de sinaptosomas corticales de rata y ratón, al menos en tres condiciones: en estado de reposo; tras la despolarización con altas concentraciones de  $K^+$ , donde se acelera la respiración por el incremento de la permeabilidad al  $Na^+$  a través de la membrana plasmática, lo que estimula la función de la ATPasa  $Na^+/K^+$ , incrementando la demanda energética (Erecinska *et al.*, 1991; Raatikainen *et al.*, 1991); y tras la estimulación con ATP, que puede actuar bien a través de sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos (Zimmerman, 1994), o directamente sobre los enzimas mitocondriales. Por tanto, aunque está ampliamente descrito que el MTT se reduce por mitocondrias activas de células vivas, y que este ensayo puede servir casi exclusivamente para medir la proliferación celular y la citotoxicidad, también el MTT puede ser útil como un índice del estado funcional y del comportamiento energético de los sinaptosomas de corteza cerebral de roedores (Martínez-Martos *et al.*, 2000), aportando un dato interesante para ser relacionado con otros parámetros bioquímicos y fisiológicos en diferentes tipos de estudios bajo condiciones basales o estimuladas.

### **1.3. SOBRE EL MÉTODO QUIMIOLUMINISCENTE PARA LA DETECCIÓN DE RADICALES LIBRES.**

En biología, muchos compuestos de interés están presentes en los fluidos corporales en concentraciones tan bajas que los métodos analíticos comunes no son eficientes para su determinación. Se propuso que la determinación de estos compuestos mediante el uso de reacciones antígeno-anticuerpo se haría tras el marcaje radiactivo de una de las partes, el antígeno, para discriminar los componentes libres y unidos. Este método, que aún se utiliza en la actualidad, tiene los inconvenientes propios del uso de material radiactivo, por lo que se han buscado marcajes alternativos (Kricka y Carter, 1982; Ekins *et al.*, 1989; Svehla, 1992).

La luminiscencia y especialmente la quimioluminiscencia es una de las alternativas. Luminiscencia es un término empleado para describir la emisión de luz que ocurre cuando una molécula que está en un estado excitado se relaja a su estado de reposo. Los tipos de luminiscencia existentes difieren en la fuente de energía utilizada para obtener el estado excitado. Esta energía puede ser suministrada por radiación electromagnética (fotoluminiscencia, fluorescencia o fosforescencia), por calor (piroluminiscencia), por fuerzas de fricción (triboluminiscencia), por impacto

de electrones (catodoluminiscencia) o por cristalización (cristaloluminiscencia). En la quimioluminiscencia, la energía se produce por una reacción química (Svehla, 1992). Los luminómetros basados en la detección de luz ruda mediante tubos fotomultiplicadores están entre los recursos mas baratos de este campo (Van Dyke *et al.*, 1985; Stanley, 1992a,b).

Rongen y colaboradores han revisado las principales ventajas del uso de quimioluminiscencia (Rongen *et al.*, 1994) destacando la gran respuesta linear, que alcanza hasta seis órdenes de magnitud; la rápida emisión de luz, especialmente cuando se genera un flash simple; la alta estabilidad de los reactivos y su bajo precio. También se ha apuntado el corto tiempo de incubación necesario debido a la alta sensibilidad lograda, la completa compatibilidad con inmunoensayos homogéneos o heterogéneos, competitivos o no competitivos, directos o indirectos o ensayos inmunométricos desarrollados en formatos de uno o dos pasos y finalmente la ausencia de toxicidad. Estas declaraciones que fueron validas hasta 1994, especialmente la última, todavía permanecen en vigor (Dodeigne *et al.*, 2000).

La quimioluminiscencia puede definirse simplemente como la luz emitida por una reacción química (Svehla, 1992). Esta reacción química debe producir energía en cantidad suficiente (aproximadamente  $300 \text{ KJ mol}^{-1}$  para emisión de luz azul y  $150 \text{ KJ mol}^{-1}$  para emisión de luz roja) para inducir la transición de un electrón de su estado de reposo al estado excitado. Esta transición electrónica a menudo se acompaña de cambios vibracionales y rotacionales en la molécula. El retorno del electrón a su estado de reposo se acompaña de la emisión de un fotón, y al fenómeno se le llama quimioluminiscencia. La molécula excitada también puede perder energía por otras vías (reacciones químicas, por desactivación, por choques, conversión interna o cruce entre sistemas). Estos procesos de pérdida de energía no son deseables desde el punto de vista analítico cuando compiten con la quimioluminiscencia (Dodeigne *et al.*, 2000).

Aunque los animales luminosos se conocen desde la antigua Grecia, la quimioluminiscencia “artificial” fue descrita por primera vez al observarse la emisión de luz amarilla cuando el oxígeno era burbujeadado en una solución etanólica alcalina de 2,4,5-trifenil-imidazol (lofina). Posteriormente, se demostraron las propiedades luminiscentes del luminol. Los derivados de la acridina fueron conocidos como moléculas quimioluminogénicas desde que se describieran la emisión de luz azul o verde de la lucigenina. Finalmente se propuso un mecanismo basado en la formación de un ciclo de dioxetanona para explicar la quimioluminiscencia de las sales de acridina, y posteriormente se han descrito derivados del dioxetano y dioxetanediona (peroxisalato) como compuestos quimioluminiscentes (Dodeigne *et al.*, 2000).

Los compuestos quimioluminogénicos más utilizados son las acilhidracinas, como es el (iso)luminol (figura V.1.1.). Estos compuestos necesitan un catalizador para la emisión de luz y un potenciador para ser competitivos en términos de sensibilidad. Esto tiene el inconveniente de que puede producir una gran cantidad de señales de fondo. Los

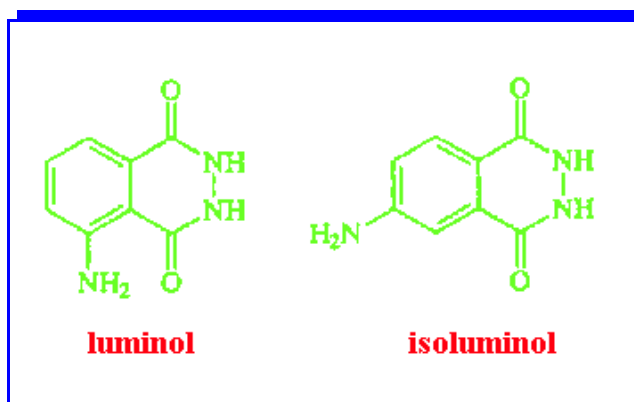


Figura V.1.1. Estructura del luminol y del isoluminol.

derivados de la acridina, por su parte, tienen una alta producción de cuantos incluso tras el acoplamiento a las proteínas y como no necesitan catálisis, las señales de fondo son bajas y se obtiene alta sensibilidad. La emisión de luz instantánea, que se considera una desventaja de estos compuestos (por problemas de medida), permite altos índices de muestreo en analizadores automáticos (Dodeigne *et al.*, 2000).

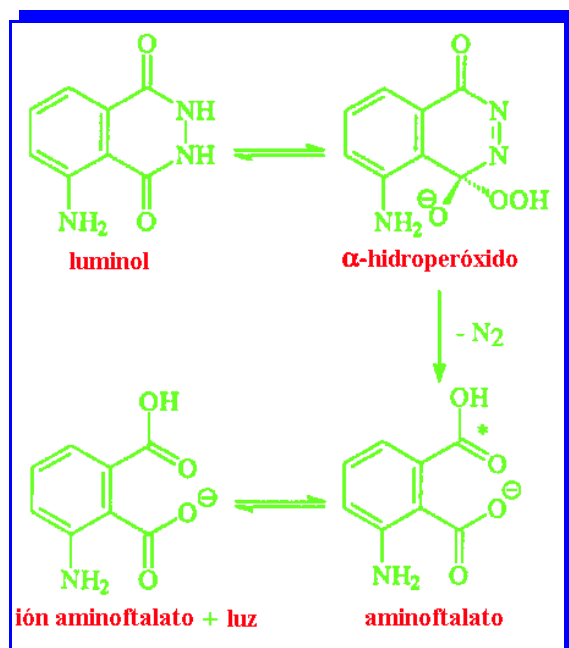


Figura V.1.2. Reacción simplificada del mecanismo del luminol: el intermediario clave es un α-hidroperóxido obtenido por oxidación del anillo. Su descomposición origina el ión aminofталato con emisión de luz.

Los derivados del luminol reaccionan siguiendo un esquema de reacción que viene dado por la figura V.1.2. El intermediario clave es un α-hidroperóxido obtenido por oxidación del anillo heterocíclico, cuyo patrón de descomposición, que lleva al estado excitado y la emisión de luz, es único y depende solo del pH del sistema. Al contrario, el primer paso depende fuertemente de la composición del medio (Merenyi *et al.*, 1990).

En medios aproticos (DMSO o dimetilformamida), solamente se necesita oxígeno y una base fuerte para la quimioluminiscencia (Schroeder y

Yeager, 1978). En disolventes proteicos distintos derivados del oxígeno ( $O_2$ ,  $O_2^-$  o  $H_2O_2$ ) pueden oxidar a los derivados del luminol si bien la reacción necesita ser catalizada enzimáticamente (Dodeigne *et al.*, 2000). Se han descrito enzimas, como la microperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de rábano picante, catalasa, xantina oxidasa (Jansen *et al.*, 1989; Radi *et al.*, 1989; 1990), metaloproteínas como el citocromo C (Akhrem *et al.*, 1985), hemoglobina (Kozlov *et al.*, 1990), deuterohemina, además de catalizadores minerales como el ozono molecular y aniones persulfato o halógenos o cationes Fe(III), Co(II) y Cu(II) y sus complejos (Schroeder y Yeager, 1978; Van Dyke *et al.*, 1985; Rongen *et al.*, 1994).

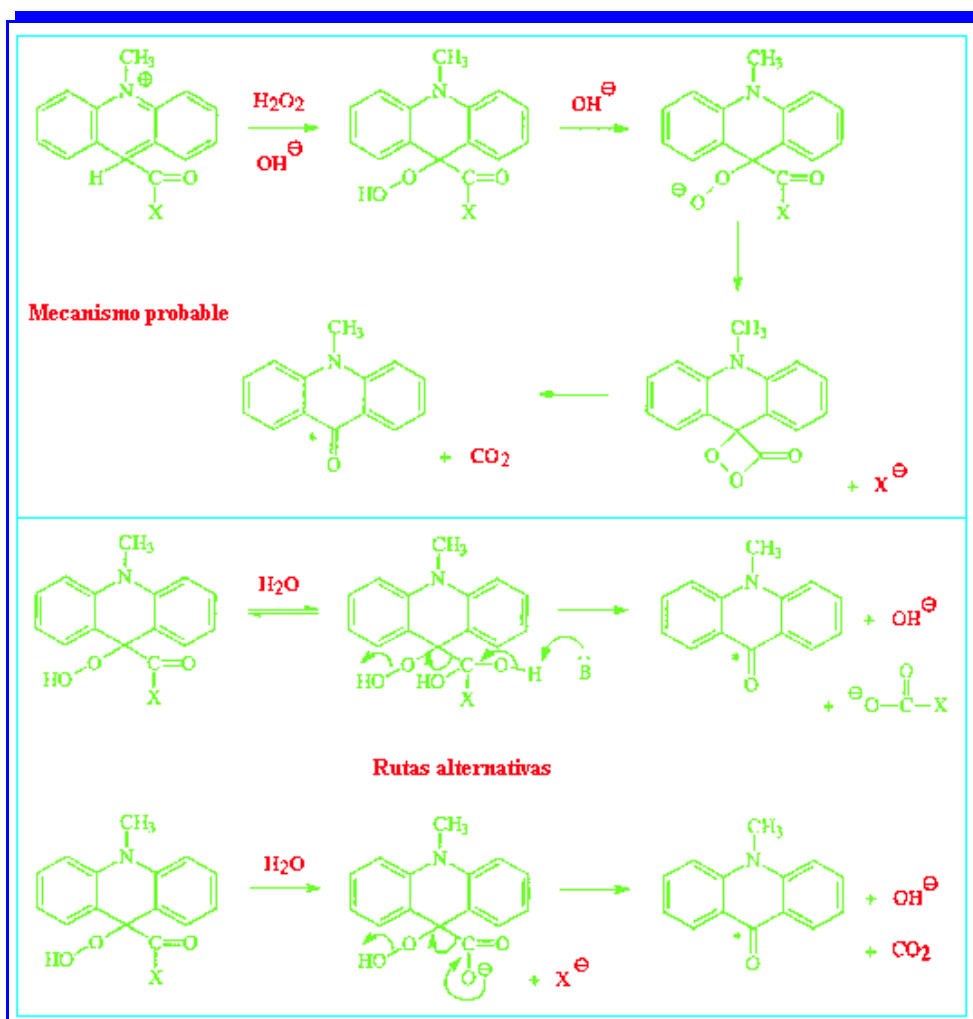
Por lo que respecta a las propiedades luminiscentes de estos compuestos, hay que indicar que la producción de cuantos del luminol (*figura V.1.2.*) no excede del 5% en DMSO (Van Dyke *et al.*, 1985) y del 1-1.5% en sistemas acuosos (Schroeder y Yeager, 1978). El isoluminol es mucho menos eficiente. Es por ello que se han hecho intentos por diferentes caminos para mejorar la eficiencia.

El uso de la quimioluminiscencia ha sido descrito para el análisis de diversos parámetros biológicos como glucosa, contenido de fosfolípidos, colesterol, elementos traza, tioles, etc. (Huang *et al.*, 1991; Matsubara *et al.*, 1992; Hasebe *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1997; Barnett *et al.*, 1999; Kubo *et al.*, 1999), e incluso para predecir el curso de enfermedades infecciosas (Iunuskhodzhaev *et al.*, 1989; Rogovine y Mushtakova, 1995).

Los derivados del oxígeno producidos como radicales libres también pueden ser detectados por quimioluminiscencia con el luminol. El  $H_2O_2$  fue el primero en el que se pensó como única especie implicada en la quimioluminiscencia (Wymann *et al.*, 1987) pero pronto se sospechó y posteriormente se confirmó que el  $O_2^-$  y los  $OH^-$  también participan de la luminiscencia (Lock *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1991). Recientemente, se ha visto cierta especificidad de los derivados del isoluminol por los radicales libres de oxígeno originados en el medio extracelular. Esta especificidad ha sido relacionada con la incapacidad del isoluminol para penetrar en la célula (Lundqvist *et al.*, 1995; Lundqvist y Dahlgren, 1996). Los niveles de quimioluminiscencia encontrados correlacionan bien con distintos tipos de enfermedades crónicas o agudas (Anton *et al.*, 1988; Asman *et al.*, 1988; Coble *et al.*, 1988; Piergiacomini *et al.*, 1988; Popov *et al.*, 1990; Dodeigne *et al.*, 2000). Así por ejemplo, estudios de quimioluminiscencia en leucocitos han llevado a comprender las enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios.

Por lo que respecta a los derivados de la acridina, como la lucigenina, fue McCapra (McCapra, 1976) quien se dedicó a su estudio. El mecanismo de reacción más probable en este caso es el que se presenta en la *figura V.1.3.* Para que se de

quimioluminiscencia de los derivados de la acridina solamente se necesitan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La lucigenina reacciona con el para formar un derivado del dioxetano (Svelha, 1992).



**Figura V.1.3.** Representación esquemática del mecanismo mas probable de obtención de los derivados de acridina y otras rutas alternativas.

Excepto la lucigenina y las arilmetilen-N-metil-dihidroacridinas, todos los derivados de la acridina están formados por dos partes: el heterociclo de acridina y el grupo radical. Cada parte juega un papel importante en la emisión de luz.

Por lo que respecta a las propiedades luminiscentes de estos compuestos indicar que, generalmente, los derivados de la acridina emiten luz en forma de flashes

cortos tras la puesta en marcha de la reacción química, siendo las características de emisión de luz relativamente independientes del microambiente. Además, la alta producción de cuantos y la baja señal de fondo permiten detecciones muy sensibles. Es por ello que los derivados quimioluminogénicos de la acridina han sido muy útiles para la detección mediante ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) de distintos parámetros como la TSH (hormona estimulante de tiroxina) (Berry *et al.*, 1988; Zucchelli *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1990), marcadores tumorales (Weeks *et al.*, 1983a,b), inmunoglobulinas y compuestos relacionados (Hart y Taaffe, 1987).

Además, la lucigenina es muy utilizada para la cuantificación específica de  $O_2^-$  tras el estrés oxidativo (Klegeris *et al.*, 1995; Kuçukkaya *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996; Gasbarrini *et al.*, 1998).

#### **1.4. SOBRE LAS SUSTANCIAS QUE REACCIONAN CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO COMO ÍNDICE DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.**

En los sistemas biológicos se producen roturas de hidroperóxidos lipídicos que dan lugar a los aldehidos (McBrien y Slater, 1982; Poli *et al.*, 1985; Chan, 1987). La identificación y análisis de estos compuestos son un índice útil del grado de peroxidación lipídica, lo cual es importante para elucidar el papel de los aldehidos como agentes causantes de ciertas patologías (Comporti, 1985; Poli *et al.*, 1985; Chan, 1987). Existen diferentes métodos analíticos, tanto cualitativos como cuantitativos para analizar estos compuestos, si bien se presta especial atención al MDA y al 4-hidroxinonenal (HNE) (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

El HNE es el mayor producto de la descomposición peroxidativa de los ácidos grasos polinsaturados omega-6 y tiene propiedades citotóxicas, hepatotóxicas, mutagénicas y genotóxicas (Comporti, 1985; Poli *et al.*, 1985; Esterbauer *et al.*, 1988). Existen niveles elevados de HNE bajo condiciones de estrés oxidativo en plasma y varios órganos (Esterbauer y Zollner, 1989; Vigo-Pelfrey, 1990). Además, la peroxidación lipídica genera muchos otros aldehidos que pueden ser también de significancia toxicológica (Schauenstein *et al.*, 1977; Comporti, 1985; Poli *et al.*, 1985; Vigo-Pelfrey, 1990).

Sin embargo el MDA es el aldehido individual más abundante de la peroxidación lipídica, y su determinación mediante el uso del TBA es uno de los métodos más comunes en los estudios de peroxidación lipídica (Esterbauer y Cheeseman, 1990). El MDA *in vitro* puede alterar proteínas, ADN, ARN y muchas otras biomoléculas (Schauenstein *et al.*, 1977). En este método, una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de TBA obteniéndose un máximo de absorción

a 532-535 nm (color rosa). Se suele mezclar la muestra con TCA helado para precipitar las proteínas (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

Existen muchos factores que van a influenciar los resultados obtenidos con el método del TBA (Bird y Draper, 1990; Esterbauer *et al.*, 1990), como pueden ser la preparación del TBA en soluciones de ácidos fuertes, las altas concentraciones de metales como el hierro o de azúcares como la sacarosa y el uso de todo el tejido como muestra.

Está bien documentado que el método del TBA no es específico para el MDA, ya que existe una gran variedad de sustancias, además del MDA, que bajo condiciones apropiadas forman complejos de TBA rosas. Además, el MDA, o sustancias como el, se pueden originar en el ensayo por la descomposición térmica de sus precursores (Marcuse y Johansson, 1973; Gutteridge, 1981; Witz *et al.*, 1986). Se ha demostrado que usando el protocolo descrito para muestras de tejido peroxidado como los microsomas, hay menos producción de artefactos del MDA o interferencias con otras sustancias positivas al TBA (Esterbauer y Slater, 1981; Esterbauer *et al.*, 1982; Lang *et al.*, 1984; Esterbauer *et al.* 1990).

En los procedimientos estándar, muchos de los precursores potenciales del MDA son eliminados por la precipitación del TCA frío previo al ensayo. Otros compuestos positivos al TBA que pueden estar presentes en el sobrenadante desproteinizado, tales como aldehídos, aminoácidos, azúcares e hidroperóxidos de ácidos grasos, dan un color débil en el ensayo estándar del TBA. La absorción a 530-535 nm producida por estos compuestos es varios ordenes de magnitud menor que la absorción producida por el MDA. Los compuestos positivos al TBA interferirían significativamente con la determinación estándar del MDA (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

La situación puede ser completamente diferente si las condiciones de la reacción estándar se alteran significativamente, por ejemplo calentando en presencia de la fracción completa de tejido, prolongando los tiempos de reacción, usando otros ácidos y suplementando la mezcla de la reacción con hierro. No cabe duda de que los test del TBA modificados son mucho menos específicos, y es apropiado referirse en tales casos a la medida de sustancias positivas al TBA, TBARS o simplemente valores de TBA en vez de especificar MDA (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

Frecuentemente se utilizan modificaciones del test del TBA empleando toda la muestra acidificada. Hay un método con ácido fosfórico que mide MDA y/o TBARS unidos a proteínas; parece que bajo las condiciones del ensayo la unión es, al menos en parte, reversible.

Aunque se han introducido muchas variaciones en el método, calentar la muestra con TBA en una solución ácida es común a todas. Esto puede ser una fuente de error si solo se mide la absorbancia a 530-535 nm. Así, a menudo se forman compuestos amarillos con un máximo a 450-490 nm y una absorbancia significativa a 530-535 nm, que conllevan a una sobrestimación de los TBARS. Es recomendable, por tanto, analizar el espectro en el rango de 430-600 nm y comprobar la existencia del máximo a 532 nm típico del complejo MDA-TBA. En cualquier caso, la cantidad exacta del complejo MDA-TBA en la mezcla de reacción puede ser determinada por HPLC (Bird *et al.*, 1983; Bird y Draper, 1990).

En conclusión, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos con el ensayo del TBA están muy influenciados por las condiciones de la reacción. Y si la muestra se calienta en una solución de TBA ácida hay que tener presente que la absorción resultante a 530-535 nm (o la fluorescencia a 553 nm) puede deberse bien al MDA preexistente, bien al MDA unido a proteínas y peróxidos lipídicos al igual que de otras sustancias que dan MDA o TBARS en ácidos calientes. Es por ello que los análisis en los que se utiliza solo la fracción soluble de TCA de la muestra son mas específicos para el MDA libre, aunque en este caso las interferencias pueden ser causada por otros compuestos solubles en TCA, en particular, si el MDA libre es bajo, como ocurre en muestras de tejido fresco (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

### **1.5. SOBRE LA FORMACIÓN DE GRUPOS CARBONILO COMO ÍNDICE DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.**

En muchos procesos fisiológicos y patológicos tiene lugar una modificación covalente postranslacional de las proteínas, consistente en la denominada oxidación catalizada por metales (Davies, 1986; Oliver *et al.*, 1987b). Dentro de estos procesos se incluyen los de envejecimiento, recambio de proteínas intracelulares, artritis y enfermedades pulmonares. En este contexto, la introducción de grupos carbonilos en los residuos aminoacídicos de las proteínas es un índice de la modificación oxidativa. La detección de estos grupos con los reactivos específicos proporciona, por tanto, métodos para detectar y cuantificar la oxidación de proteínas. También hay otros cambios inducidos por la oxidación catalizada por metales que pueden ser utilizados como índices de la oxidación de proteínas. Aquí se incluyen la pérdida de actividad catalítica (Levine *et al.*, 1981; Fucci *et al.*, 1983; Levine, 1983), la pérdida de residuos de His (Levine, 1983), cambios en la hidrofobicidad de superficie (Cervera y Levine, 1988) y alteraciones en el espectro ultravioleta de la proteína (Levine *et al.*, 1981; Fucci *et al.*, 1983; Levine, 1983; Cervera y Levine, 1988; Rivett y Levine, 1990). Sin embargo, muchos de estos índices alternativos son útiles solamente cuando se tienen proteínas purificadas. Por tanto, el análisis del contenido en grupos carbonilo de las proteínas es actualmente el método mas adecuado para evaluar la

oxidación proteica. Los residuos aminoácidos que adquieren grupos carbonilos no han sido identificados completamente, pero el  $\gamma$ -Glu-semialdehído parece ser el más importante (Levine *et al.*, 1990).

No obstante, hay que tener presente que los grupos carbonilos pueden aparecer de forma natural en el caso de proteínas glicosiladas enzimáticamente o como resultado de la glicosilación no enzimática (Cerami, 1985).

Aunque los procedimientos para el análisis del contenido en grupos carbonilo se han utilizado tanto en proteínas purificadas como en extractos crudos (Benedetti *et al.*, 1982; Levine, 1983; Oliver, 1987; Oliver y Levine, 1987; Oliver *et al.*, 1987a,b; Starke *et al.*, 1987; Simic *et al.*, 1989), hay que tener en cuenta que la presencia de grupos carbonilo no es totalmente específica de los procesos oxidativos en el caso de extractos crudos o de homogenados, ya que los ácidos nucleicos van a interferir en el análisis y deben ser eliminados previamente. Además, las proteínas oxidadas son particularmente susceptibles a la degradación proteolítica (Rivett, 1986).

El mecanismo de oxidación catalizada por metales de las proteínas ha sido descrito en detalle (Hayaishi *et al.*, 1989). En resumen, un catión metálico susceptible (por ejemplo  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) se une a un sitio de unión de un catión divalente de la proteína. La reacción con  $O_2$  o  $H_2O_2$  genera especies de oxígeno reactivas, las cuales oxidan a los residuos aminoácidos en el sitio de unión del catión o en un sitio próximo a él. Como ya se ha mencionado, esta reacción normalmente inactiva a los enzimas, presumiblemente por destrucción del sitio de unión del catión esencial (Levine *et al.*, 1990).

El reactivo clásico para la determinación de grupos carbonilo como índice de la oxidación de proteínas es la 2,4-DNP (Fields y Dixon, 1971; Levine, 1983). El contenido en grupos carbonilos detectado por este método es equivalente a otros métodos radiactivos siempre y cuando la cantidad de muestra sea suficiente (preferiblemente más de 0.5 mg de proteína) (Levine *et al.*, 1990).

#### **1.6. SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.**

Para la detección de una AP, con absoluta garantía de su naturaleza, se exigen métodos de determinación que pudieran resultar engorrosos; ya que se necesitaría la presencia de un péptido sustrato para el enzima de secuencia conocida y en estado prácticamente puro y del manejo de técnicas sofisticadas tales como la HPLC o los analizadores de aminoácidos. Menos problemáticas resultarían las técnicas de

cromatografía en capa fina o en papel, aunque en estos casos existirían problemas de cuantificación de la actividad enzimática.

Tales técnicas pueden ser utilizadas actualmente, de hecho algunos investigadores las utilizan para demostrar la actividad de una AP purificada sobre un determinado péptido, pero no estaban al alcance de los investigadores de hace cincuenta años. Estos decidieron perfeccionar las primitivas determinaciones de la actividad AP (que se realizaban midiendo el incremento del contenido de aminoácidos de la muestra incubada) utilizando sustratos artificiales hidrolizables por estas enzimas y cuyos productos fuesen fácilmente detectables y medibles.

El primer sustrato artificial utilizado para la determinación de una AP fue la L-leucinamida (Linderstrom-Lang, 1929). Inmediatamente se sugirió el nombre de LeuAP para el enzima, dado que no hidrolizaba los derivados N-acetilados de la L-leucinamida. El enzima no restringe su actividad al aminoácido Leu, sino que puede hidrolizar otras amidas sintéticas y distintos polipéptidos biológicamente activos. Los métodos de determinación de los productos de las hidrólisis de la L-leucinamida (Leu y amoniaco) son muy variados, ya que el pH óptimo de la reacción es de 8-9, y a pH 7.4 el enzima es prácticamente inactivo. Es dudoso que la actividad de hidrólisis de L-leucinamida sea la misma que la detectada con otros sustratos artificiales. Por tanto, la clásica LeuAP es distinguible de otras AP que funcionan a pH próximo al neutro.

Sin lugar a duda, los sustratos artificiales más usados para la determinación de AP han sido las aminoacil- $\beta$ -naftilamidas, derivados amídicos de la  $\beta$ -naftilamina. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954), y desde entonces se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas mediante el bloqueo del grupo N-terminal del aminoácido con diversos grupos químicos. En principio, la  $\beta$ -naftilamina liberada por acción enzimática se acopla a una sal diazólica para producir un color rojo o azul dependiendo de la sal de acoplamiento considerada, y se mide espectrofotométricamente a 520-540 nm. Este ha sido el método seguido en este trabajo de investigación para la determinación de la actividad AP (véase material y métodos). Este método se ha aplicado también a la determinación histoquímica de AP (Gomori, 1954). Pero existe otro método para medir la  $\beta$ -naftilamida, y este es el método fluorimétrico, sin necesidad del posterior acoplamiento, a 335 nm de excitación y 412 nm de emisión. A los enzimas que hidrolizan las aminoacil- $\beta$ -naftilamidas (arilamidas), y para diferenciarlos de otras AP que no hidrolizan a estos sustratos, se los ha denominado “arilamidasa”.

Dado que la  $\beta$ -naftilamida es, con toda probabilidad, un agente carcinógeno y no es recomendable su uso rutinario, se han sintetizado otros sustratos de AP en los últimos años que también se utilizan en la actualidad. Nagatsu y colaboradores (1976) introdujeron las aminoacil-p-nitroanilidas como sustratos que liberan p-nitroanilina y que se determinan espectrofotométricamente a 380 nm. Finalmente, Prusak y colaboradores (1980) e Imai y colaboradores (1983), han utilizado las aminoacil-7-amido-4-metil-cumarinas como sustratos de AP. La 4-metil-cumarina liberada por estos enzimas puede medirse fluorimétricamente a 460 nm, con excitación a 380 nm.



## 2. SOBRE LOS RESULTADOS.

### 2.1. SOBRE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Como se discutirá mas adelante, el presente estudio demuestra la capacidad del alcohol, tanto *in vitro* como *in vivo*, de modificar en distinta dirección la actividad de diversas AP de la corteza cerebral de ratón, de un modo dependiente de la presencia o no del ión calcio en el medio. Esta capacidad moduladora del alcohol sobre la actividad de los enzimas proteolíticos no parece relacionada con posibles fenómenos neurotóxicos inducidos por la administración *in vitro* o la ingesta *in vivo* de alcohol.

Aunque esté bien descrito que el consumo crónico de etanol durante largos periodos de tiempo puede dañar directamente el sistema nervioso (King *et al.*, 1988) bien por él mismo, por medio de su metabolito oxidativo acetaldehido (Bondy y Guo, 1995; Hunt, 1996) o bien a través de sus metabolitos no oxidativos tales como los ésteres de ácidos grasos (Bora y Lange, 1993; De Jersey y Treolar, 1994) o el fosfatidiletanol (Gustavsson, 1994; Dodd *et al.*, 2000), nuestros resultados demuestran escasos signos de toxicidad tras la administración de etanol *in vitro*, y unos signos algo más relevantes de toxicidad tras la ingesta de etanol *in vivo*.

Así, utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, cuando se administra alcohol *in vitro* no se detectan incrementos en la formación de radicales libres (especialmente  $O_2^{\cdot-}$ ) con respecto a los controles ni en condiciones basales ni en condiciones despolarizantes, e independientemente de la presencia o no de calcio en el medio. Utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, si aparecen pequeños incrementos de radicales libres (debidos preferentemente a los singletes de oxígeno) con las dosis mas altas de alcohol en condiciones basales en presencia de calcio en el medio, si bien no se detectan cambios en ausencia de calcio en el medio en condiciones basales o cuando el alcohol está presente en condiciones despolarizantes, independientemente de la presencia o no de calcio en el medio.

Tras la ingesta de alcohol *in vivo*, y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, tampoco se detectan variaciones en la formación de radicales libres en condiciones basales e independientemente de la presencia o no de calcio en el medio. Si aparece un incremento en la formación de radicales libres tras la ingesta *in vivo* de alcohol en condiciones despolarizantes y en presencia de calcio en el medio de incubación, pero no en ausencia de él. Cuando se utiliza luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, la ingesta de alcohol *in vivo* provoca un incremento en la producción de radicales libres tanto en condiciones basales como en condiciones despolarizantes, si bien esto solo tiene lugar en presencia de calcio en el medio de incubación.

Los pequeños incrementos en los niveles de radicales libres detectados en condiciones basales tras la administración de alcohol *in vitro* pueden ser consecuencia del aumento de la actividad mitocondrial que tiene lugar también en condiciones basales en presencia de calcio en el medio, pero no en ausencia de este, como se demuestra utilizando el ensayo del MTT. No obstante, en condiciones despolarizantes y en presencia de calcio en el medio, también se detecta, cuando se administra alcohol *in vitro*, un incremento de la actividad mitocondrial que no se ve reflejado en la producción de radicales libres que puede detectarse por quimioluminiscencia potenciada por luminol o lucigenina. Es probable que en estas condiciones despolarizantes los mecanismos antioxidantes que actúan normalmente sean capaces de anular el leve efecto que parece ser inducido por el alcohol en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, en ausencia de calcio en el medio, la actividad mitocondrial no se modifica en condiciones despolarizantes o incluso disminuye con altas concentraciones de alcohol, probablemente por la pérdida de la homeostasis que se origina y/o la alteración de las membranas sinaptosomales.

Por el contrario, la ingesta de alcohol *in vivo* no modifica la actividad mitocondrial en condiciones basales en presencia de calcio, e incluso la disminuye en ausencia de calcio, mientras que en condiciones despolarizantes la ingesta de alcohol *in vivo*, tanto cuando el medio contiene calcio como cuando no, la actividad mitocondrial disminuye. Es probable, por tanto, que los radicales libres detectados tras la ingesta de alcohol *in vivo* sean consecuencia directa de la acción del alcohol e independientes de la actividad mitocondrial. De hecho, otros autores también han descrito que la ingesta crónica de alcohol potencia la formación de radicales libres a nivel cerebral (Montoliu *et al.*, 1994).

En cualquier caso, la leve producción de radicales libres observada en condiciones basales en un medio con calcio tras la administración de alcohol *in vitro* no parece tener capacidad de inducir neurodegeneración, ya que no se detecta ni peroxidación de los lípidos de membrana ni oxidación de las proteínas

sinaptosomales como se demuestra analizando los TBARS o el contenido en grupos carbonilo de las proteínas respectivamente. En ausencia de calcio en el medio, si se detecta, con la administración de alcohol *in vitro*, cierto incremento en la formación de TBARS aunque no en el contenido de grupos carbonilo, bien con la mayor concentración de alcohol en condiciones basales, o en condiciones despolarizantes. Estos indicios de neurodegeneración inducidos por la administración de alcohol *in vitro* podrían ser consecuencia de la acción de otros radicales libres distintos de las especies reactivas de oxígeno o del OH<sup>-</sup>, que no parecen ser detectado por los potenciadores de la señal quimioluminiscente luminol y lucigenina (Muller-Peddinghans, 1984), utilizados en el presente estudio.

Por otro lado, tras la ingesta de alcohol *in vivo* tampoco se detecta peroxidación lipídica en los sinaptosomas ni en condiciones basales ni en condiciones despolarizantes cuando el medio contiene calcio. Sin embargo, el contenido en grupos carbonilo de las proteínas, y en contra de lo que cabría esperar, disminuye de forma acusada. Es muy probable que esta disminución en el contenido de grupos carbonilo de las proteínas tras la ingesta *in vivo* de alcohol sea consecuencia de posteriores modificaciones en estas moléculas no relacionadas con fenómenos neurotóxicos. De hecho, se han descrito alteraciones estructurales de las proteínas que alteran su contenido en grupos carbonilo por procesos de glicosilación tanto enzimática como no enzimática (Levine *et al.*, 1990). El papel del alcohol en estos procesos necesita de una investigación más profunda. Sin embargo, es muy interesante destacar como tras la ingesta de alcohol *in vivo* si se detectan niveles elevados de peroxidación lipídica en condiciones basales cuando el medio no contiene calcio, fenómeno también descrito por Montoliu y colaboradores (1994). No obstante, este incremento en los niveles de peroxidación lipídica tampoco modifica el contenido en grupos carbonilo de las proteínas. Y por el contrario, en condiciones despolarizantes y en ausencia de calcio en el medio, los niveles de peroxidación lipídica encontrados tras la ingesta de alcohol *in vivo* son muy bajos. Normalmente, las células están equipadas con mecanismos de defensa antioxidativos de muy diverso tipo, que van desde moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, los tocoferoles o la vitamina E, hasta sistemas enzimáticos mas complejos como el de la SOD o el de la catalasa. El mantenimiento de un adecuado equilibrio entre elementos prooxidantes y antioxidantes se puede ver alterado de muy diversas formas como consecuencia de la acción del alcohol (Olanow, 1993).

Nuestros resultados, en cualquier caso, apuntan hacia un papel destacado de los niveles de calcio en estos indicios de toxicidad imputables al alcohol. En este sentido, también se ha descrito que el etanol es un inhibidor potente de la función del receptor NMDA en una variedad de preparaciones neuronales de cerebro y neuronas en cultivo (Woodward, 1999; Smothers *et al.*, 2001). El etanol inhibe las corrientes

---

catiónicas vía receptor NMDA (Wirkner *et al.*, 1999) y de una forma menos extendida vía receptor AMPA (Netzeband *et al.*, 1999), produciendo depresión del incremento del calcio intracelular (Dodd *et al.*, 2000), lo cual puede ser responsable de los pequeños signos de toxicidad encontrados tras el tratamiento con etanol.

Finalmente, indicar que resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Ramírez-Expósito *et al.*, 2002) han demostrado en ratón que los procesos neurotóxicos, incluso en aquellas condiciones en las que se producen grandes incrementos en los niveles de peroxidación lipídica, no provocan ningún tipo de alteración en los niveles de actividad de un amplio rango de AP cerebrales.

## 2.2. SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.

Durante mucho tiempo se ha pensado que el mecanismo de acción del alcohol a nivel molecular se basa en la alteración del orden de las membranas biológicas, incrementando su fluidez (Sánchez-Amate *et al.*, 1992; 1995) y, posiblemente, perturbando la función de las proteínas que se hallan insertas en la membrana (Diamond y Gordon, 1997; Eckardt *et al.*, 1998). Sin embargo, las dosis de alcohol necesarias para producir estos efectos han sido siempre relativamente altas, por encima de 50 mM.

Más recientemente se ha sugerido que dosis más bajas de alcohol pueden actuar directamente sobre proteínas concretas y, más específicamente, sobre canales operados por receptor, como los del GABA o Glu. Mas aun, diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el etanol a concentraciones consideradas no tóxicas e incluso inferiores, inhiben la función de los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales representarían una diana especialmente importante del alcohol dentro del SNC (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997) .

Es por esta razón que en la presente Tesis Doctoral se ha utilizado un amplio rango de concentraciones de alcohol en el caso de los estudios *in vitro*, para analizar su influencia sobre las distintas actividades AP, y que al mismo tiempo nos ayuden a comprender el efecto del alcohol ingerido por los animales *in vivo*.

De forma general, podemos indicar que el alcohol tiene la capacidad de modificar de distinto modo la actividad de enzimas proteolíticos del tipo de las AP en la corteza frontal de ratón a nivel de la sinapsis, tanto *in vitro* como *in vivo*, en condiciones basales y despolarizantes, y de una forma dependiente de la presencia o no de calcio en el medio de incubación.

### **2.2.1. Sobre la Actividad de Aminopeptidasas Neutras (AlaAP, CysAP, LeuAP y TyrAP) y Básicas (ArgAP).**

Por lo que respecta a la actividad de las AP neutras y básicas, en los estudios *in vitro*, en condiciones basales y en presencia de calcio, el alcohol ejerce un claro efecto inhibitorio sobre la AlaAP sinaptosomal de forma dosis-dependiente. Por el contrario, las actividades ArgAP, CysAP, LeuAP y TyrAP sinaptosomales muestran un comportamiento bifásico dependiendo de la concentración de alcohol utilizada. En ausencia de calcio en el medio, la actividad AlaAP sinaptosomal solo fue inhibida por la concentración mas alta de alcohol, mientras que la actividad ArgAP sinaptosomal si se inhibe de forma dosis-dependiente. Por otro lado, las actividades CysAP, LeuAP y TyrAP sinaptosomales muestran un comportamiento bifásico similar al observado en presencia de calcio. Por tanto, la modulación por alcohol de las actividades AlaAP y ArgAP a nivel basal seria calcio-dependiente, mientras que la regulación de las actividades CysAP, LeuAP y TyrAP por alcohol en condiciones basales parece ser calcio-independiente. De hecho, a nivel del sobrenadante, CysAP, LeuAP y TyrAP mostraron un comportamiento parecido en presencia y ausencia de calcio, mientras que AlaAP se incrementa en presencia de calcio o no se modifica por etanol en ausencia de calcio en el medio de incubación. La actividad ArgAP del sobrenadante, por su lado, fue inhibida por el etanol en presencia de calcio en el medio e incrementada en ausencia de calcio.

Sin embargo, los estudios *in vivo* presentan resultados diferentes. Así, en condiciones basales, la ingesta de alcohol *in vivo* no modifica la actividad AlaAP sinaptosomal en presencia de calcio, pero se inhibe en ausencia de calcio. El mismo comportamiento se observa en la actividad LeuAP sinaptosomal. Por el contrario, las actividades ArgAP, CysAP y TyrAP sinaptosomales son inhibidas tras la ingesta de alcohol *in vivo* tanto en presencia como en ausencia de calcio. A nivel del sobrenadante, sin embargo, todas las actividades (AlaAP, ArgAP, CysAP, LeuAP y TyrAP) se inhibieron tras la ingesta de alcohol *in vivo*, independientemente de la presencia o no de calcio en el medio de incubación.

Estos cambios inducidos por el alcohol podrían deberse a un efecto directo de este compuesto y/o de sus metabolitos sobre las distintas actividades AP o bien a su influencia sobre los constituyentes de las membranas sinaptosomales, que probablemente tendrán lugar de distinto modo tras su administración *in vitro* o tras la ingesta de alcohol *in vivo*, y que podrían ser responsables de las diferencias de comportamiento encontradas, especialmente para las actividades AlaAP y ArgAP. Como apuntábamos anteriormente, está bien descrito que el alcohol incrementa la fluidez de la membrana (Sánchez-Amate *et al.*, 1992; 1995) y cambia su composición lipídica, alterando una amplia variedad de funciones de las proteínas insertas en ella (Diamond y Gordon, 1997). El etanol también induce la liberación de

neurotransmisores en sinaptosomas no estimulados independientemente de la concentración de calcio extrasinaptosomal, lo cual indica la existencia de una redistribución de calcio intracelular. De hecho, el etanol induce la liberación de calcio de forma dependiente de la concentración, en el rango de 30-50 mM, indicando que los efectos estimuladores del etanol en la liberación basal de neurotransmisores puede ser debido a la liberación microsomal de calcio (Shah y Pant, 1988). Estos movimientos de calcio pueden estar relacionados con los efectos del etanol sobre las actividades AP tanto sinaptosomales como del sobrenadante, más aún cuando se ha propuesto un mecanismo para la liberación de algunas AP parecido a la liberación de los neurotransmisores clásicos (Mayas *et al.*, 2000a), lo que otorga un papel esencial al calcio iónico.

En segundo lugar, tanto *in vitro* como *in vivo* la despolarización de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM provoca la inhibición de las actividades AlaAP y TyrAP sinaptosomales en un medio con calcio, mientras que el resto de actividades no se modifica. Sin embargo, la despolarización en un medio sin calcio, provoca en todos los casos (a excepción de la AlaAP sinaptosomal, que disminuye) un incremento de la actividad en mayor o menor grado. Por otro lado, en el sobrenadante, la despolarización de los sinaptosomas en presencia de calcio incrementó todas las actividades AP, pero las inhibió o no las modificó (como la AlaAP) en ausencia de calcio. Se puede hablar, por tanto, en este caso, de una regulación calcio-dependiente de la actividad AP bajo condiciones despolarizantes.

El incremento de las actividades AP en el sobrenadante en presencia de calcio puede ser probablemente el resultado de la liberación de enzimas de los sinaptosomas al medio de incubación, como hemos citado anteriormente. Esto puede ser indicativo de que los péptidos activos y las peptidasas que se encargan de degradarlos pueden ser liberados juntos a la hendidura sináptica para que regulen la función neurotransmisora/neuromoduladora de esos péptidos por un mecanismo dependiente de calcio. En ausencia de calcio, los cambios observados pueden deberse a la imposibilidad de los enzimas de ser liberados bajo condiciones despolarizantes en un medio libre de calcio, o a la consecuencia de la redistribución del calcio intracelular. Estos movimientos de calcio pueden ser responsables de las diferentes respuestas de las AP al etanol dependiendo de la presencia o ausencia de calcio en el medio, como también hemos apuntado anteriormente.

Una tercera observación ha sido que la presencia de alcohol en condiciones despolarizantes en un medio con calcio provoca una inhibición de todas las actividades AP en sinaptosomas, si bien para la AlaAP el comportamiento es variable en función de la concentración de alcohol utilizada. Por el contrario, en ausencia de calcio, la concentración menor de etanol (25 mM) incrementa las actividades AP

sinaptosomales mientras que las concentraciones mayores indujeron un efecto inhibitor. Por otro lado, en el sobrenadante y en presencia de calcio el etanol inhibió fuertemente el incremento de las actividades AlaAP y TyrAP tras la estimulación con  $K^+$  25 mM. Además, el aumento de la estimulación con potasio observado en las actividades ArgAP, CysAP y LeuAP del sobrenadante se potencia con las concentraciones mas bajas de etanol pero se inhibe con las mas altas. En ausencia de calcio y en el sobrenadante, la actividad AlaAP disminuye solamente con las concentraciones mas altas de alcohol, mientras que este compuesto bloquea completamente la disminución de las actividades ArgAP y CysAP inducida por potasio, siendo necesaria en este último caso la concentración mas alta de etanol. Finalmente, el etanol no solo bloquea la disminución estimulada por potasio de las actividades LeuAP y TyrAP del sobrenadante sino que la incrementa en diferente grado según la concentración de etanol usada.

Por otro lado, tras la ingesta de alcohol *in vivo* en condiciones despolarizantes, encontramos que las actividades AlaAP, LeuAP y TyrAP sinaptosomales no se modifican en presencia de calcio, mientras que las actividades ArgAP y CysAP sinaptosomales se inhiben. En ausencia de calcio, sin embargo, todas las actividades AP sinaptosomales se inhibieron. Del mismo modo, en el sobrenadante, y tanto en presencia como en ausencia de calcio, todas las actividades AP resultaron inhibidas en condiciones despolarizantes tras la ingesta de alcohol.

Se ha demostrado que la adición de alcohol *in vitro* a sinaptosomas de ratón o rata inhibe la recaptación de calcio dependiente de la despolarización, sin afectar a la recaptación bajo condiciones no despolarizantes. Estos resultados sugieren que los conocidos efectos inhibidores del etanol en la liberación estimulada de neurotransmisores puede ser mediada por la inhibición del flujo de calcio dependiente de la despolarización (Canda *et al.*, 1995). Probablemente el bloqueo de los canales de calcio dependiente de voltaje de los sinaptosomas pueda ser el responsable de estos efectos del etanol sobre las actividades AP. Es mas, aunque ciertas concentraciones de etanol cooperan para evitar la liberación del enzima de los sinaptosomas, otros lo incrementan, probablemente debido a la redistribución intrasinaptosomal de calcio inducida por el etanol, como se dijo previamente.

Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran, en términos generales, un efecto inhibitor del alcohol sobre las actividades AP neutras y básicas. Esto ocurre tanto en condiciones basales como en condiciones despolarizantes, cuando se utiliza un medio fisiológico normal, con niveles adecuados de calcio. Aparece, además, una importante tendencia a un comportamiento bifásico, dependiente de la concentración de alcohol utilizada. En este sentido, hay que considerar que los efectos del alcohol son la suma de la interacción con múltiples sistemas

---

neurotransmisores/neuromoduladores (DA, 5HT, GABA, Glu y neuropéptidos) (Mayas *et al.*, 2000a). Sin embargo, la contribución particular de cada sistema neurotransmisor conforme la concentración de alcohol varía, puede constituir la base neuroquímica de la dosis-dependencia y/o los comportamientos bifásicos de los efectos del alcohol. Así, a una cierta dosis un sistema neurotransmisor/receptor específico puede ser más prominente que otro para contribuir a un efecto particular del alcohol. En cualquier caso, estos efectos moduladores del etanol sobre las actividades AP no parecen estar relacionados con procesos neurotóxicos inducidos por el etanol, como se ha discutido anteriormente.

Como hemos referido, los cambios inducidos por el alcohol en las actividades AP podrían deberse a un efecto directo del alcohol y/o sus metabolitos sobre los distintos enzimas, o bien a su influencia sobre los constituyentes de las membranas sinaptosomales. Las primeras hipótesis para explicar los efectos del alcohol sobre el SNC, sugerían que los efectos del alcohol sobre el SNC se debían a su naturaleza anfipática, que produciría una perturbación física de la matriz lipídica de las membranas neuronales y daría lugar a cambios en la actividad de las proteínas unidas a membrana (Sánchez-Amate, 1995; Eckardt *et al.*, 1998). Sin embargo, a concentraciones farmacológicas importantes (10- 20 mM), el efecto del alcohol en la fluidez de membrana es muy pequeño o casi indetectable, y no mayor del que podría esperarse por la simple variación diaria de la temperatura corporal (Tabakoff *et al.*, 1996). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que existen proteínas neuronales que son muy sensibles al alcohol, las denominadas ERA (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997), entre las que se encuentran diversas subunidades, complejos proteicos de membrana como canales iónicos operados por ligando y otras proteínas implicadas en los procesos neuronales de transducción de señales. Cabe, por tanto, la posibilidad de que las AP formen parte de este grupo de proteínas diana que denominadas ERA.

Los conocimientos sobre la influencia del alcohol sobre las actividades de AP neutras y básicas a nivel cerebral son escasos. Witek y Kolataj han descrito en la fracción lisosomal de cerebro de ratón una inhibición de la actividad AlaAP y LeuAP que depende tanto de la concentración de alcohol administrada como de la duración del tratamiento (Witek y Kolataj, 1999). Resultados similares se han encontrado en hígado, riñón y músculo (Witek y Kolataj, 1999). Sin embargo, se conoce más sobre el efecto del alcohol sobre la actividad AP sérica, donde se ha encontrado un potente efecto inhibitor del principal metabolito del alcohol, el acetaldehído, aunque no del alcohol por si mismo (Brecher *et al.*, 1996) sobre las actividades AlaAP y ArgAP. Estos resultados sugieren que las modificaciones en la actividad AP descritas en el presente trabajo podrían ser consecuencia de la acción del acetaldehído más que del alcohol, ya que este podría generarse en los sinaptosomas, como consecuencia del

metabolismo del alcohol (Veloso *et al.*, 1972; Tabakoff y Von Wartburg, 1975; Zimatkin y Dietrich, 1997). Este aspecto necesitaría, por tanto, una investigación más profunda.

Las variaciones inducidas por alcohol en las distintas actividades AP analizadas en el presente estudio son importantes porque reflejan el estado funcional de sus correspondientes sustratos endógenos los cuales tienen importantes funciones en diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores. En este punto, debemos indicar que habitualmente se han descrito a las AP como enzimas no específicos capaces de hidrolizar un amplio espectro de sustratos peptídicos endógenos así como derivados arilamidas, en distinto grado. Sin embargo, nuestros resultados, utilizando sinaptosomas, demuestran la existencia de diferentes patrones de actividad AP en respuesta a la administración *in vitro* o a la ingesta *in vivo* de alcohol, por lo que estas actividades probablemente sean muy específicas para sus sustratos endógenos y puedan modularlos muy estrictamente dependiendo del microambiente en el que se encuentren. Uno de estos sistemas neuromoduladores/neurotransmisores es el de los péptidos opiáceos del tipo de las encefalinas, susceptibles de ser hidrolizados por la AlaAP y LeuAP (APM), ArgAP (APB) y TyrAP (encefalinas) (Schnebli *et al.*, 1979; Wagner *et al.*, 1981; Berg y Marks, 1984; Hersh, 1985). Se sabe que, en general, estos péptidos ( $\beta$ -endorfina, encefalinas y dinorfinas) están implicados en el abuso de alcohol (Blum *et al.*, 1989), si bien hay una fuerte influencia de las características genéticas de los animales (Gianoulakis y Gupta, 1985). Se ha demostrado que la administración crónica de alcohol en ratas provoca un incremento de los niveles de Leu-encefalina en la corteza cerebral y de la Met-encefalina en el estriado, médula oblonga y tálamo (Burov *et al.*, 1983). Sin embargo, si la administración de alcohol se prolonga, se encuentra una disminución de ambas encefalinas en el estriado, tálamo y médula oblonga y un incremento de la Leu-encefalina en la corteza cerebral (Burov *et al.*, 1983). También se ha descrito que los niveles de encefalinas se incrementan en todas las regiones cerebrales de ratas con SFA y cuyos padres estuvieran expuestos al alcohol (Nelson *et al.*, 1988). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral apoyarían estas observaciones, ya que la inhibición de las actividades AP antes citadas mantendrían elevados los niveles de sus sustratos, potenciando su acción. Por otro lado, en condiciones despolarizantes, se ha comprobado que la administración repetida de alcohol reduce la liberación evocada por potasio de Met-encefalinas en lonchas de hipotálamo. Esto podría implicar la existencia de una modulación como consecuencia de la exposición crónica, pero no aguda, al alcohol de la sensibilidad de distintas poblaciones neuronales al efecto despolarizante del potasio (Przewlocka y Lason, 1991). Esta sensibilidad alterada podría ser también el reflejo de un comportamiento diferencial de los receptores específicos, como se ha sugerido para los receptores de encefalinas de tipo  $\delta$  pero no para los de tipo  $\mu$  ante la administración crónica de etanol

---

(Przewlocka y Lason, 1990). El hecho de que nuestros resultados muestren que el alcohol provoca una disminución de las distintas actividades AP, especialmente de la TyrAP (encefalinas) como consecuencia de la despolarización en un medio con calcio, podría ser reflejo también de estos fenómenos, además de apoyar la hipótesis de una liberación conjunta del neuropéptido y del enzima encargado de su degradación.

Otros sistemas neurotransmisores/neuromoduladores importantes implicados en la tolerancia y dependencia al alcohol son aquellos mediados por la oxitocina y la vasopresina, péptidos ambos susceptibles de ser hidrolizados por la CysAP (Itoh y Nagamatsu, 1995). La oxitocina es un neuropéptido neurohipofisiario sintetizado en el cerebro y secretado por la hipófisis posterior, que también es liberado a nivel del SNC. Este neuropéptido está asociado, junto con otros, con distintos procesos adaptativos del SNC relacionados con la adicción y tolerancia al alcohol, donde actúa inhibiendo la tolerancia al alcohol. En el SNC, la tolerancia al alcohol parece ser un proceso combinado de componentes celulares y de comportamiento, que tiene relación con el aprendizaje, ya que los animales muestran tolerancia sólo en el ambiente donde se les administró inicialmente el alcohol, pero no en ambientes nuevos (Kovács *et al.*, 1998). Un modelo adecuado para investigar este fenómeno consiste en el desarrollo de una tolerancia rápida al efecto hipotérmico del alcohol (Szabó *et al.*, 1985;1987). Pues bien, la administración de oxitocina evita el desarrollo de la rápida tolerancia al etanol en ratones, de forma especialmente potente, si se administra a nivel central (Szabó *et al.*, 1989). Esto apoya la teoría de que la oxitocina actúa sobre el SNC para influenciar la respuesta adaptativa a las drogas en general y al alcohol en particular.

La administración central de oxitocina a dosis que inhiben el desarrollo de una rápida tolerancia al alcohol, incrementa, además, los niveles de NA en el hipotálamo, de DA en el estriado y la médula oblonga y de 5HT en el hipocampo y el estriado (Szabó *et al.*, 1988b), es decir, que afecta profundamente a la neurotransmisión por monoaminas. El mecanismo de acción del alcohol sobre estos neurotransmisores en el SNC no está claro. Parece ser que tanto la neurotransmisión serotoninérgica como la dopaminérgica se alteran durante la inhibición del desarrollo de la tolerancia provocada por la oxitocina (Szabó *et al.*, 1988b).

Con estos y otros resultados, parece claro que este, y quizá otros neuropéptidos, modulan la respuesta al alcohol en particular y a las drogas de abuso en general. En el caso de la oxitocina, los componentes adaptativos de la adicción a la droga parecen ser los afectados en primer lugar. Así, el neuropéptido inhibe el desarrollo de la tolerancia al alcohol. El alcohol actúa sobre el SNC a través de múltiples mecanismos y la oxitocina inhibiría los procesos adaptativos en respuesta

al alcohol. Debido a la implicación de esta transmisión oxitocinérgica, y por extensión, de los receptores de oxitocina en estos efectos, se ha propuesto que las neuronas oxitocinérgicas del SNC (principalmente localizadas en el cerebro basal y las estructuras límbicas) son elementos integrantes de la respuesta adaptativa del cerebro al alcohol. La respuesta adaptativa del SNC a la administración repetida de la droga da lugar a la tolerancia y a la dependencia física y psicológica. La activación de la neurotransmisión oxitocinérgica en el cerebro bajo estas circunstancias puede representar un mecanismo fisiológico de compensación importante, especialmente en la adaptación neuronal temprana y podría prevenir el rápido inicio de la tolerancia y dependencia a la droga (Kóvacs *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran un claro efecto inhibitor del etanol sobre la actividad CysAP, que actuaría potenciando la función de la oxitocina.

Por lo que respecta a la vasopresina, es un neuropéptido que también participa en el desarrollo de tolerancia y/o dependencia física al alcohol. Junto con otros péptidos, la vasopresina también está relacionada con los mecanismos de aprendizaje y/o memoria, aunque probablemente la tolerancia al alcohol implica estructuras diferentes a las implicadas en la memoria (Hoffman y Tabakoff, 1981). En cualquier caso, estos efectos parecen ser modulados a través de la actividad del receptor V1 de la vasopresina y la producción de segundos mensajeros (Briley *et al.*, 1994), preferentemente en el septo y el hipocampo, pero no en la corteza cerebral. Por otro lado, la inyección intracerebroventricular de vasopresina en ratones provoca un incremento sustancial en el ARNm del protooncogen *c-fos*, que parece jugar un papel importante en los procesos de neuroadaptación, y podría ser importante para la función de la vasopresina en la tolerancia al alcohol (Giri *et al.*, 1990). Nuestros resultados también apoyarían un efecto potenciado de la vasopresina como consecuencia de la inhibición provocada por el alcohol sobre el enzima encargado de su degradación.

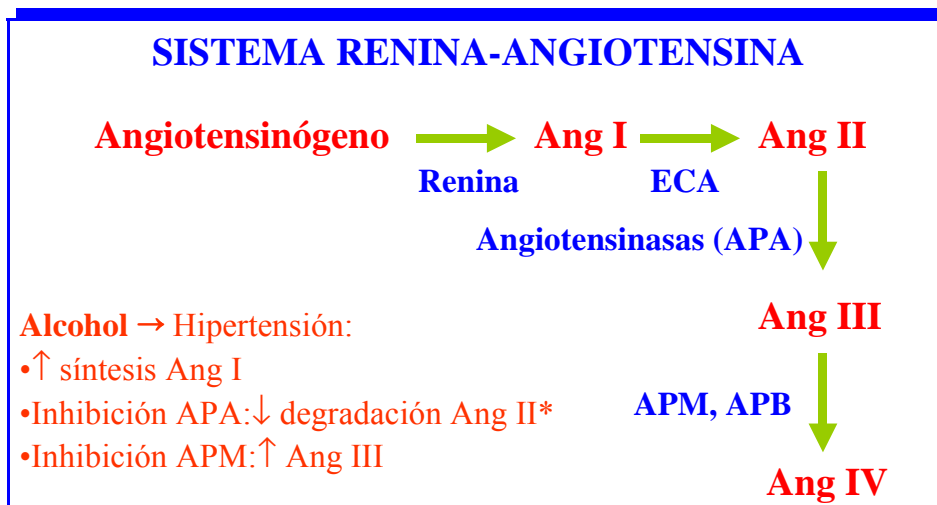
Estas observaciones son interesantes porque pueden dar luz a como un péptido endógeno puede modular las funciones adaptativas del SNC actuando a través de sus propios receptores y modificando la eficacia de los sistemas neurotransmisores clásicos. En general, la vida media de los neuropéptidos endógenos, una vez sintetizados y liberados, es parecida a la de los neuropéptidos administrados exógenamente. Unos y otros están presentes en el cerebro y los fluidos corporales durante unos pocos minutos. Sin embargo, sus efectos se detectan mucho tiempo después de su liberación/administración. Por tanto, los neuropéptidos deben poner en escena varios procesos secundarios en el SNC que hagan viables todos estos cambios, probablemente a través de mecanismos moleculares, induciendo cambios en la expresión génica. De hecho, se ha demostrado que la administración de alcohol y otras drogas de abuso induce cambios en la expresión génica tanto *in vitro* como

---

*in vivo*, que serán, posiblemente, los responsables de la respuesta celular de la tolerancia y la dependencia (Mackler y Eberwine, 1991). Para nuestro conocimiento, no existe información acerca del efecto del alcohol sobre la expresión génica de las AP. También se ha descrito que el tratamiento crónico con alcohol reduce significativamente el número de neuronas que contienen vasopresina y otros péptidos (Madeira *et al.*, 1997), por lo que no se descarta que la vasopresina este influenciada o inflencie a otros sistemas neurotransmisores, como citábamos anteriormente.

Pero la actividad de los enzimas AlaAP y LeuAP (ApM) y ArgAP (ApB) es, además, importante en el SRA. Este sistema se encarga del control a corto y largo plazo de la presión sanguínea a través de varias acciones directas e indirectas de la Ang II (Ganong, 1995). Además del SRA clásico, también se ha descrito un SRA tisular (Ganong, 1994), que ha sido considerado como la posible ruta de síntesis de Ang II producida localmente en el cerebro (De Gasparo *et al.*, 1994; Sim *et al.*, 1994). Además, la Ang II es hidrolizada por diversas angiotensinasas (APA) cuyo papel discutiremos mas adelante, responsables primeros de romper el aminoácido Asp N-terminal, dando lugar al heptapéptido Ang III, que también posee actividad biológica, especialmente en el cerebro. A continuación, sobre la Ang III pueden actuar otras AP (las anteriormente citadas AlaAP y LeuAp (APM) y ArgAP (APB) para separar la Arg N-terminal (Kugler, 1982) y dar lugar al heptapéptido Ang IV, que también ha demostrado poseer actividad biológica (Wright y Harding, 1995) (*figura V.2.1.*). El abuso crónico del alcohol puede dar lugar a una alteración en los mecanismos de regulación del flujo sanguíneo cerebral y/o del balance de líquidos y electrolitos en este tejido, por estimulación del SRA cerebral y el sistema nervioso es especialmente sensible a estos procesos, dando lugar a una gran variedad de cambios celulares y vasculares (Amenta *et al.*, 1996). De hecho, se ha propuesto que uno de los mecanismos que contribuyen a la hipertensión en los alcohólicos es la modificación del SRA (Brecher *et al.*, 1996). Los efectos inhibidores del alcohol sobre las actividades AlaAP, ArgAP y LeuAP sugieren la existencia de niveles elevados de Ang III, la cual presenta un importante efecto presor a nivel cerebral, probablemente por su reacción sobre los receptores AT1 (De Gasparo *et al.*, 1994). En este sentido, Thevananther y Brecher han sugerido que un posible factor puede ser la interacción con el metabolito acetaldehído, que provoca un incremento en la velocidad de síntesis de la Ang I (Thevananther y Brecher, 1994). También se ha sugerido que podría existir una disminución de la velocidad de degradación de la Ang II por sus enzimas degradativos. Así, se ha demostrado que el acetaldehído inhibe la actividad angiotensinasa A (Brecher *et al.*, 1996). Como veremos mas adelante de forma mas detallada, la presencia de alcohol en el medio de incubación inhibe la actividad APA (GluAP y AspAP) de sinaptosomas corticales de ratón (Mayas *et al.*, 2000b). También se ha descrito que el acetaldehído inhibe la AlaAP, potenciandose paralelamente el efecto presor de la Ang III (Brecher *et al.*, 1996), la cual es

especialmente activa en el cerebro (De Gasparo *et al.*, 1994). Nuestros resultados confirman nuevamente esta hipótesis, al obtenerse un claro efecto inhibitor del alcohol sobre las actividades AlaAP, LeuAP y ArgAP. Por tanto, es lógico pensar que las limitaciones en la inactivación de la Ang II/Ang III por las distintas AP presentes en el tejido nervioso como consecuencia del efecto del alcohol (bien directamente, bien a través de su metabolito acetaldehído) pueden tener un papel importante en promover los incrementos de la presión sanguínea encontrada en los individuos alcohólicos, especialmente a nivel local del cerebro.



**Figura V.2.1.** Participación de la actividad AP en el SRA y como el alcohol puede modificarlo. La renina actúa en el interior de la cadena péptidica del angiotensinógeno dando lugar a AngI. Sobre este péptido (inactivo) actúa la enzima convertidora de angiotensina (ECA) para originando uno de los péptidos mas activos del sistema, la Ang II. Esta es hidrolizada por diversas angiotensinasas (APA) formando la AngIII, que también posee actividad biológica. Sobre la AngIII actúan otras AP, principalmente la ApB y ApM dando lugar a la AngIV.

Como conclusión de este apartado, podemos decir que las modificaciones de las actividades AlaAP, ArgAP, CysAP, LeuAP y TyrAP inducidas por el alcohol en sinaptosomas de ratón no reflejan el resultado de un posible daño tisular, sino el hecho de que el alcohol puede modular el funcionamiento de diversos neuropéptidos y péptidos activos que actúan en el SNC, a través de los enzimas encargados de su degradación, probablemente como resultado de las complejas interacciones del alcohol con los diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores del SNC que están implicados en la tolerancia y/o dependencia al etanol.

### 2.2.2. Sobre la Actividad de Aminopeptidasas Ácidas (AspAP y GluAP).

En la presente Tesis Doctoral se han descrito varias observaciones importantes en relación con la actividad de AspAP y GluAP. En primer lugar se ha descrito la capacidad del etanol, bien administrado *in vitro* o tras su ingesta *in vivo*, de modificar tanto la actividad AspAP como la GluAP, en diferente dirección a nivel de la sinapsis.

En los estudios *in vitro* se observa que, aunque bajo condiciones basales el etanol inhibe la actividad AspAP y GluAP en sinaptosomas, independientemente de la presencia de calcio en el medio, en el sobrenadante, la actividad AspAP no cambia o incrementa solamente con las dosis bajas de alcohol en presencia de calcio, pero presenta un efecto bifásico en ausencia de calcio. Sin embargo, la actividad GluAP del sobrenadante se inhibe por alcohol en presencia de calcio en el medio, o muestra un efecto bifásico similar al de AspAP en ausencia de calcio en el medio.

Por su parte, tras la administración de alcohol *in vivo*, las actividades AspAP y GluAP sinaptosomales no se modifican en presencia de calcio en el medio, pero ambas se inhiben en ausencia de calcio. A nivel del sobrenadante, también ambas actividades AspAP y GluAP se inhiben tras la ingesta de alcohol *in vivo* cuando el medio contiene calcio, si bien en ausencia de calcio, la actividad AspAP sigue siendo inhibida mientras que la actividad GluAP se incrementa.

Los cambios observados en la actividad Asp y GluAP pueden deberse a un efecto directo del etanol y/o sus metabolitos sobre estas enzimas. También puede ser la consecuencia de los efectos del etanol en los constituyentes de las membranas sinaptosomales. Se ha descrito ampliamente que el etanol aumenta la fluidez de las membranas y cambia su composición lipídica alterando una gran variedad de funciones de la membrana (Sánchez-Amate, *et al.*, 1995; Diamond y Gordon, 1997). Además, estudios más recientes han sugerido que la hipótesis primera de que el etanol actúa de una forma no selectiva alterando la microfluidez de las membranas biológicas, puede ser verdad solo con concentraciones superiores a aquellas farmacológicamente activas (Woodward, 1999). Probablemente, los efectos del etanol se deban a cambios en ciertos receptores de neurotransmisores tales como los NMDA (Wirkner *et al.*, 1999), los GABA<sub>A</sub> (Grobin *et al.*, 2000), y los canales iónicos dependientes de voltaje (Hollmann y Heinemann, 1994; Lovinger, 1997). Pero el etanol también induce la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas no estimulados independientemente de la concentración extrasinaptosomal de calcio, indicando una redistribución de calcio intracelular (Shah y Pant, 1988), la cual puede estar relacionada con los efectos moduladores del etanol sobre la actividad AspAP y GluAP del sobrenadante.

En segundo lugar, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo* observamos que la estimulación con  $K^+$  25 mM en presencia de calcio induce un incremento de la actividad AspAP y GluAP tanto en sinaptosomas como en el sobrenadante. El incremento de estas actividades en el sobrenadante puede deberse, probablemente, a un proceso de liberación de los enzimas desde los sinaptosomas al medio de incubación, como previamente habíamos descrito para otras actividades AP. Esto podría indicar que los péptidos activos y los enzimas encargados de su degradación pueden liberarse juntos a la hendidura sináptica para regular la función neurotransmisora/neuromoduladora de estos péptidos. En ausencia de calcio, sin embargo, el comportamiento de AspAP y GluAP es diferente; así, mientras la actividad AspAP sinaptosomal aumenta de forma notable y la actividad del sobrenadante disminuye, la actividad GluAP sinaptosomal se incrementa levemente en sinaptosomas y de forma notable en el sobrenadante. Estos cambios pueden ser debidos a la imposibilidad del AspAP de ser liberado bajo condiciones despolarizantes en un medio libre de calcio, por un mecanismo que no afecta a la GluAP, como puede ser la redistribución intracelular de calcio.

Una tercera observación con la administración de alcohol *in vitro* ha sido que en presencia de calcio el etanol inhibe los incrementos producidos al estimular con  $K^+$  25 mM, de las actividades AspAP y GluAP en sinaptosomas y sobrenadantes. En ausencia de calcio, el etanol también inhibe la liberación estimulada por potasio de AspAP en sinaptosomas. Sin embargo, en el sobrenadante, un efecto bifásico induce el aumento o la inhibición de la actividad AspAP, dependiendo de la concentración de etanol utilizada. Por el contrario este efecto bifásico aparece en al GluAP sinaptosomal en ausencia de calcio, mientras que en el sobrenadante el etanol bloquea completamente el incremento estimulado por potasio de la actividad GluAP, disminuyendola por debajo de los niveles controles.

Tras la administración de alcohol *in vivo*, tanto la actividad AspAP como GluAP sinaptosomal se inhiben en presencia de calcio, pero no se modifican en ausencia de calcio. A nivel del sobrenadante, tanto la actividad AspAP como la GluAP se inhiben en un medio con calcio, si bien en ausencia de calcio la actividad AspAP se inhibe mientras que la actividad GluAP no se modifica.

Se ha demostrado que la adición *in vitro* de etanol a sinaptosomas de rata o ratón inhibe la recaptación de calcio en condiciones despolarizantes sin afectar la recaptación bajo condiciones no despolarizantes. Estos resultados sugieren que los conocidos efectos inhibidores del etanol en la liberación evocada de neurotransmisores pueda ser mediada por la inhibición del flujo de calcio dependiente de la despolarización (Canda *et al.*, 1995). Probablemente, el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje en sinaptosomas pueden ser

responsables de estos efectos del etanol sobre las actividades AspAP y GluAP. De hecho, resultados previos de nuestro laboratorio, han sugerido que los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N están implicados en la liberación estimulada por potasio de la pGluAP (Ramírez-Expósito *et al.*, 2000a).

Por otro lado, el hecho de que algunas concentraciones de etanol cooperan en evitar la liberación del enzima desde los sinaptosomas, otras concentraciones aumentan la actividad enzimática en el sobrenadante, probablemente debido a la redistribución intrasinaptosomal de calcio inducida por el etanol, como se discutía anteriormente.

Otra de las observaciones obtenida en la presente Tesis Doctoral nos lleva a la invalidación de la idea de que el exceso de aminoácidos liberados por la actividad AspAP y GluAP induzca neurodegeneración tras el tratamiento con alcohol bajo nuestras condiciones experimentales. Así, el preferente efecto inhibitor del alcohol sobre estas actividades AP no contribuiría a un aumento en el conjunto de aminoácidos acídicos libres. Esto está corroborado, además, por los escasos signos de toxicidad encontrados tras la administración de alcohol tanto *in vitro* como *in vivo*, como se ha discutido anteriormente.

En quinto lugar, los presentes resultados evidencian cambios importantes en las actividades AspAP y GluAP como consecuencia de la administración de etanol. El SRA, en el que estas dos actividades participan, está implicado en la patogénesis de la hipertensión. Sus principales péptidos bioactivos, la Ang II y III, participan en el incremento de la presión sanguínea de varios modos como son la vasoconstricción directa, la activación del sistema nervioso simpático (Skoog, 1998), la inhibición sináptica del reflejo baroreceptor a nivel del núcleo del tracto solitario y la liberación de la hormona hipofisaria vasopresina (Phillips, 1987; Hohle *et al.*, 1995; Zini *et al.*, 1996), induciendo un incremento en el apetito de la sal y de la ingesta de bebida (Phillips, 1987; Saavedra, 1992; Wright y Harding, 1997). La estimulación de la liberación de vasopresina por Ang II y III es probablemente uno de los mecanismos por los que estos péptidos regulan la homeostasis de líquidos y electrolitos bajo condiciones de hipovolemia, mediante la reducción de la pérdida renal de agua e incrementando la presión sanguínea (Renaud y Bourque, 1991). El cerebro es especialmente sensible a la hipertensión, la cual causa una gran variedad de cambios celulares y vasculares (Amenta *et al.*, 1996). Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran en general un efecto inhibitor del etanol sobre las actividades AspAP y GluAP bajo condiciones basales y estimuladas, pudiendo indicar la existencia de altos niveles de Ang II y niveles menores de Ang III, provocando, por tanto, a priori un incremento en la presión sanguínea. No obstante, las funciones de la Ang II y Ang III en el control de la presión sanguínea no están claras. La inhibición

de la formación de Ang III endógena en el cerebro por la inyección central del inhibidor de la APA denominado EC33 induce un gran descenso de la presión sanguínea de forma dosis-dependiente. También, el bloqueo de la APA por la administración intracerebroventricular de antisuero inhibe la actividad de este enzima y disminuye el incremento de la presión sanguínea inducido por la Ang II en un 59% (Song *et al.*, 1997). Por tanto, parece ser la Ang III cerebral endógena, pero no la Ang II, como ocurre a nivel periférico, la que ejerce su efecto estimulador en el control de la presión sanguínea (Reaux *et al.*, 1999b). Además, la infusión central de APA induce un incremento significativo en la presión sanguínea debido al mayor nivel de producción de Ang III cerebral. Estos estudios muestran evidencias claras de que la Ang III, producida por la acción de APA sobre la Ang II, es el péptido más efectivo del SRA cerebral, ejerciendo un efecto tónico estimulador en el control de la presión sanguínea. Sin embargo, la similar afinidad de la Ang II y Ang III por los receptores AT1 no explica porque la conversión de la Ang II cerebral a Ang III es un requisito para aumentar la presión sanguínea. Hasta ahora se han dado dos razones, la primera es que puede haber otros receptores semejantes a los AT1 específicos para la Ang III, con un perfil farmacológico similar al del receptor AT1 y la segunda es que es posible que el bloqueo de la conversión de Ang II a Ang III favorezca la activación de otras rutas metabólicas que inactiven a la Ang II y produzca fragmentos de péptido que no puedan unirse a los receptores AT1 o AT2 (Chansel *et al.*, 1998; Ferrario *et al.*, 1997; Reaux *et al.*, 2001).

Pero como indicábamos anteriormente, la Ang II y la Ang III también estimulan la liberación de vasopresina para controlar la homeostasis de líquidos y electrolitos, reduciendo la pérdida renal de agua e incrementar la presión sanguínea (Renaud y Bourque, 1991). La inyección de Ang II o Ang III en los núcleos supraóptico o paraventricular aumenta la actividad de las neuronas magnocelulares productoras de vasopresina induciendo la liberación de vasopresina en la sangre (Yamaguchi *et al.*, 1979; Hohle *et al.*, 1995; Zini *et al.*, 1996). Sin embargo, la actividad exacta de este péptido no está clara. Mientras que los niveles plasmáticos de vasopresina se duplican por la inyección intracerebroventricular de Ang II, el inhibidor EC33 de la APA inhibe la liberación de vasopresina inducida por Ang II de una forma dosis-dependiente. Esto sugiere de nuevo que la conversión de Ang II a Ang III es un paso necesario para estimular la secreción de vasopresina (Zini *et al.*, 1996; Reaux *et al.*, 1999a). Por lo tanto, el daño cerebral observado tras el consumo de etanol puede no estar exclusivamente relacionado con la regulación de la presión sanguínea, la regulación del flujo sanguíneo local o el balance de fluidos y electrolitos (Mungall *et al.*, 1995).

Finalmente indicar que aunque se ha considerado durante mucho tiempo que las actividades AspAP y GluAP se correspondían con el mismo enzima, esta desigual

---

sensibilidad al etanol y otros compuestos previamente descritos en la literatura (Ramírez-Expósito *et al.*, 1999), estaría a favor de indicar que se trata de dos enzimas con propiedades y funciones diferentes en la regulación de sus sustratos (Ramírez-Expósito *et al.*, 2000b) como se ha descrito recientemente.

### 2.2.3. Sobre la Actividad de Omega-Peptidasas (pGluAP).

Por lo que respecta a la actividad pGluAP, este estudio muestra, en primer lugar, que tras la administración de alcohol *in vitro*, el etanol tiene la capacidad de modificar la actividad del enzima pGluAP a nivel de la sinapsis, provocando una inhibición de dicha actividad en sinaptosomas y siendo este proceso independiente de la presencia de calcio en el medio en condiciones basales. En el sobrenadante, el etanol también inhibe la actividad pGluAP en presencia de calcio pero la aumenta en ausencia de calcio, con excepción de las dosis más altas que lo inhiben. Por otro lado, tras la ingesta de alcohol *in vivo*, solo en ausencia de calcio aparece a nivel basal una disminución significativa de la pGluAP sinaptosomal, mientras que a nivel del sobrenadante, la actividad pGluAP se inhibe tanto en presencia como en ausencia de calcio.

Estos cambios pueden deberse, como hemos citado para otras actividades, a un efecto directo del alcohol y/o de sus metabolitos sobre la pGluAP o a sus efectos sobre los constituyentes de las membranas, afectando a su composición lipídica y alterando sus funciones (Sánchez-Amate *et al.*, 1995; Diamond y Gordon, 1997). Puesto que el etanol también induce la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas no estimulados independientemente de la concentración de calcio extrasinaptosomal, indicando la existencia de una redistribución intracelular del calcio (Shah y Pant, 1988), se podría explicar también de este modo el efecto modulador del etanol sobre la pGluAP.

En segundo lugar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la estimulación de los sinaptosomas con  $K^+$  25 mM en presencia de calcio no modifica la actividad pGluAP sinaptosomal, pero si induce un incremento de la actividad pGluAP del sobrenadante, probablemente a través de la liberación del enzima desde los sinaptosomas al medio de incubación.

Para nuestro conocimiento, no ha sido descrita en la literatura la liberación evocada por  $K^+$  25 mM de AP a partir de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón. Esto puede sugerir, como hemos indicado para otros enzimas, que el neuropéptido y la peptidasa que se encarga de degradarlo pueden ser liberados juntos a la hendidura sináptica para regular la función neurotransmisora/neuromoduladora del péptido. En ausencia de calcio, los cambios observados, esto es, aumento de la actividad pGluAP

sinaptosomal e inhibición de la actividad pGluAP del sobrenadante, pueden ser debidos a la imposibilidad del enzima de ser liberado bajo condiciones despolarizantes en un medio sin calcio o como consecuencia de la redistribución intracelular de calcio.

Una tercera observación tras la administración de alcohol *in vitro* en condiciones despolarizantes ha sido que en presencia de calcio, el etanol inhibe la actividad pGluAP sinaptosomal. Del mismo modo el etanol inhibe el incremento de la actividad pGluAP obtenido en el sobrenadante como consecuencia de la despolarización. Tras la ingesta de alcohol *in vivo*, la actividad pGluAP sinaptosomal no cambia en condiciones despolarizantes y se inhibe en el sobrenadante.

Como hemos citado, la adición *in vitro* de etanol a sinaptosomas de rata o ratón inhibe la recaptación de calcio dependiente de la despolarización, sin afectar la recaptación bajo condiciones no despolarizantes. Estos resultados sugieren que los conocidos efectos inhibidores del etanol sobre la liberación estimulada de neurotransmisores puede estar mediada por la inhibición del flujo de calcio dependiente de la despolarización (Canda *et al.*, 1995). Probablemente, el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje de los sinaptosomas puede ser el responsable de estos efectos del etanol sobre la pGluAP.

En ausencia de calcio, tras la administración de alcohol *in vitro*, la despolarización en presencia de etanol 25 mM mostro un incremento de la actividad pGluAP sinaptosomal que coincidió con un importante descenso de dicha actividad en el sobrenadante. Esto podría sugerir que concentraciones bajas de etanol evitan la liberación del enzima desde los sinaptosomas. Sin embargo, concentraciones mayores de etanol incrementarían la actividad enzimática en el sobrenadante de forma paralela a su disminución a nivel sinaptosomal, probablemente debido a la redistribución intrasinaptosomal de calcio inducida por etanol, como ya se ha citado previamente.

Por su parte, tras la ingesta de alcohol *in vivo*, la actividad pGluAP sinaptosomal en ausencia de calcio también resulta inhibida en condiciones despolarizantes, mientras que a nivel del sobrenadante, esta actividad no cambia.

Tomados juntos, nuestros resultados indicarían que el general efecto inhibitor del etanol sobre la pGluAP bajo condiciones basales y despolarizantes provocarían un incremento en los niveles de TRH corticales, potenciando sus efectos moduladores endógenos de diferentes parámetros bioquímicos y conductuales relacionados con el consumo de etanol (McCown *et al.*, 1985). De hecho se ha descrito que la inyección intracerebroventricular de TRH cambia muchas respuestas de comportamiento en rata. Así, la TRH incrementa la locomoción, el agitación del cuerpo, el rascado o

la piloerección, y disminuye el olfateo y los periodos de descanso (Katsuura *et al.*, 1984). Este incremento en los niveles de TRH corticales, propuesto como consecuencia de la inhibición por el alcohol de la actividad pGluAP, podría ser responsable de la actitud desinhibida y eufórica característica de los individuos que ingieren alcohol. Esto se ve apoyado porque la corteza cerebral muestra un potente efecto inhibitor de los efectos de la TRH, como se ha demostrado en diversos experimentos de ablación de la corteza cerebral (Katsuura *et al.*, 1984). Además, el incremento en los niveles de TRH origina también la liberación de NA (Itoh *et al.*, 1994), contribuyendo a la acción euforizante del etanol. Por último, citar que también se ha demostrado que la cocaína incrementa los niveles de TRH en diferentes zonas cerebrales (Jaworska-Feil *et al.*, 1997), de modo que este neuropéptido podría estar implicado en los fenómenos de dependencia *in vivo* de esta y otras drogas, como puede ser el alcohol.

El enzima pGluAP se encuentra ampliamente distribuido por los fluidos y tejidos corporales. Hasta la fecha, se han descrito tres formas distintas de la pGluAP (Cummins y O'Connor, 1998). La primera, denominada pGluAP tipo I, se localiza a nivel citosólico (Mudge y Fellows, 1973; Browne y O'Cuinn, 1983; Lauffart *et al.*, 1989) y presenta una amplia variedad de sustratos pGlu terminales, incluyendo la TRH, GnRH, neurotensina o bombesina entre otros (Browne y Cuinn, 1983). La pGluAP tipo II se ha descrito como un enzima de membrana muy específico para la neurohormona TRH (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Elmore *et al.*, 1990). La tercera forma de pGluAP, denominada tiroliberinas, aparece en el suero, y sus características bioquímicas son muy semejantes a las descritas para la pGluAP tipo II (Taylor y Dixon, 1978; Bauer y Nowak, 1979; Bauer, 1981; Bauer *et al.*, 1981). Se ha descrito que es el enzima pGluAP tipo II el que aparece mayoritariamente a nivel de la hendidura sináptica, y que sería el responsable de la degradación de la TRH a este nivel, apareciendo distribuida en diferentes regiones cerebrales (De Gortari *et al.*, 1995).

Aunque se conoce relativamente bien la acción hidrolítica de las distintas formas de pGluAP sobre los péptidos naturales o los sustratos artificiales usualmente utilizados, el papel fisiológico que puedan tener estas enzimas no está bien definido. Uno de los metabolitos de la degradación de la TRH es la molécula denominada ciclo(His-Pro). Se ha demostrado que la administración de ciclo(His-Pro) modifica la hipotermia transitoria producida por el alcohol. En este sentido, el pretratamiento agudo de ratas con dosis crecientes de ciclo(His-Pro) provoca una disminución progresiva en la hipotermia inducida por alcohol, y que la administración crónica de ciclo(His-Pro) aumenta el desarrollo de tolerancia a los efectos hipotérmicos del alcohol (Prasad y Balasubramanian, 1988). El efecto inhibitor del alcohol sobre la pGluAP disminuiría los niveles de ciclo(His-Pro) disponibles, contribuyendo a la

hipotermia transitoria inducida por el alcohol. En cualquier caso, también hay que tener en cuenta que existen otros péptidos susceptibles de ser hidrolizados por la pGluAP. Así, se ha descrito que la administración intracerebral a ratones de péptidos hidrolizados por la pGluAP, como la neurotensina y bombesina, provoca un incremento en la duración del sueño provocado por la ingesta de etanol, e incluso potencian la hipotermia provocada por la ingesta de alcohol (Luttinger *et al.*, 1983). Por otro lado, también se ha descrito que diferentes péptidos, como es la bombesina, tienen un papel importante en limitar la ingesta de alcohol. La inhibición de la actividad pGluAP que induce el alcohol permitiría, en este sentido, una duración mas duradera de la bombesina a nivel cortical (Kulkosky, 1985).

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren, por tanto, que diversos neuropéptidos pueden estar implicados en los complejos mecanismos de acción del etanol sobre el SNC (incluyendo los procesos de tolerancia y dependencia), y que esta participación puede estar mediada por las modificaciones inducidas en los sistemas enzimáticos encargados de regular la actividad de dichos neuropéptidos, actuando a nivel de sus procesos degradativos.



**VI.**

**CONCLUSIONES.**



- Primera.** El análisis de las actividades AP es importante porque refleja el estado funcional de sus correspondientes sustratos endógenos, los cuales tienen importantes funciones en diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores.
- Segunda.** El alcohol tiene la capacidad de modular la actividad de diversas AP de corteza cerebral de ratón en situaciones basales y despolarizantes, tanto *in vitro* como *in vivo* y en distinta dirección dependiendo del enzima analizado y de la presencia o no de calcio en el medio de incubación. Las diferencias observadas en la calcio-dependencia entre las distintas actividades AP pueden deberse a la redistribución intracelular del calcio inducida por alcohol, independientemente de la presencia o no de calcio en el medio de incubación. El incremento de actividad AP observado en condiciones despolarizantes, puede ser el resultado de la liberación de estos enzimas al medio de incubación, sugiriendo que tanto los péptidos activos como los enzimas que los degradan pueden ser liberados juntos a la hendidura sináptica para regular la función neurotransmisora/neuromoduladora de dichos péptidos.
- Tercera.** La administración *in vitro* de alcohol, este no provoca signos importantes de neurodegeneración. Sin embargo, la ingesta *in vivo* de alcohol provoca algunos signos de toxicidad que quedan evidenciados por la alteración de diversos parámetros del estrés oxidativo. No obstante, la capacidad moduladora del alcohol sobre la actividad de las AP no parece estar relacionada con fenómenos neurotóxicos inducidos por la administración *in vitro* o la ingesta *in vivo* de alcohol.
- Cuarta.** Los cambios en la actividad AP, obtenidos tras la administración *in vitro* o la ingesta *in vivo* de alcohol, pueden ser consecuencia del efecto directo del alcohol o de sus metabolitos, bien sobre los constituyentes de las membranas sinaptosomales, en las que ocurriría una perturbación física de la matriz lipídica, bien sobre las propias

AP. Estos enzimas pueden formar parte del grupo de proteínas diana denominadas Elementos Receptivos para el Alcohol (ERA), del mismo modo que se ha descrito para otros complejos proteicos de membrana como los canales iónicos operados por ligando y otras proteínas implicadas en procesos neuronales de trasducción de señales.

**Quinta.** Los efectos de la administración *in vitro* o la ingesta *in vivo* de alcohol sobre las actividades AP indican que diversos neuropéptidos, como los péptidos opiáceos, oxitocina, vasopresina, TRH o los péptidos del SRA cerebral, pueden estar implicados en los complejos mecanismos de acción del alcohol sobre el sistema nervioso, incluyendo los procesos de tolerancia y dependencia, y que esta participación puede estar mediada por las modificaciones inducidas en los sistemas enzimáticos encargados de regular la actividad de dichos neuropéptidos, actuando a nivel de sus procesos degradativos.

**Sexta.** Los efectos del alcohol sobre el sistema nervioso son la suma de las interacciones de diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores. La contribución diferencial de cada sistema a estos efectos varía con la concentración de alcohol. Esto puede constituir la base neuroquímica del comportamiento diferencial de las actividades AP inducido por la administración *in vitro* o la ingesta *in vivo* de alcohol.





**VII.**

**BIBLIOGRAFÍA.**



Abbracchio MP, Ceruti S, Barbieri D, FC, Malomi W, Biondo L, Burnstock G, Cattabeni F. A novel action for adenosine: apoptosis of astroglial cells in rat brain primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 908-915.

Abdelhamid KM, Tymianski M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *J Neurosci* 1997; 17: 3538-3553.

Abraham MH, Lieb WR, Franks NP. Role of hydrogen bonding in general anesthesia. *J Pharmacol Sci* 1991; 80: 719-724.

Abraham WC, Hunter BE, Zornetzer SF, Walker DW. Augmentation of short-term plasticity in CA1 of rat hippocampus after chronic ethanol treatment. *Brain Res* 1981; 221: 271-287.

Abraham WC, Rogers CJ, Hunter BE. Chronic ethanol-induced decreases in the response of dentate granule cells to perforant path input in the rat. *Exp Brain Res* 1984; 54: 406-414.

Adams CWM, Glenner GG. Histochemistry of myelin-IV. Aminopeptidase activity in CNS and PNS. *J Neurochem* 1962; 9: 233-239.

Adams KM, Gilman S, Koeppe RA, Kluin KJ, Brunberg JA, Dede D, Berent S, Kroll PD. Neuropsychological deficits are correlated with frontal hypometabolism in positron emission tomography studies of older alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 42: 631-639.

Aguayo LG. Ethanol potentiates the GABA<sub>A</sub>-activated Cl<sup>-</sup> current in mouse hippocampal and cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1990; 187: 127-130.

Akhrem AA, Semenkova GN, Cherenkevich SN, Popova YM, Kiselev PA. Chemiluminescence of luminol caused by interaction of cytochrome P-450 and cytochrome C with cumene hydroperoxide: comparative studies. *Biomed Biochim Acta* 1985; 44: 1591-1597.

Alba F, Arenas JC, Iribar C, Ramírez M. Regional distribution of soluble and membrane-bound aminopeptidase activities in rat brain. *Brain Res Bull* 1993; 31: 393-396.

Allan AM, Harris RA. Acute and chronic ethanol treatment alter GABA receptor operated chloride channels. *Pharmac Biochem Behav* 1987; 27: 665-670.

Alling C, Bostrom K. Demyelination of the mammillary bodies in alcoholism, a combined morphological and biochemical study. *Acta Neuropathol* 1980; 50: 77-80.

Almeida A, Bates TE, Clark JB. Development of mitochondrial respiratory-chain complexes in neonatal rat brain. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 409.

Amenta F, Strocchi P, Sabbatini M. Vascular and neuronal hypertensive brain damage: Protective effect of treatment with nicarpidine. *J Hypertens* 1996; 14: S29-S35.

Ames A, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport. *J Neurosci* 1992; 12: 840-853.

Amit Z, Brown ZW. Actions of drugs of abuse on brain reward systems, a reconsideration with specific attention to alcohol. *Pharmac Biochem Behav* 1982; 17: 233-238.

Ammon E, Schäfer C, Hoffmann U, Klotz U. Disposition and first-pass metabolism of ethanol in human: Is it gastric or hepatic and does it depend on gender?. *Clin Pharmac Ther* 1996; 59: 503-513.

Andorn AC, Britton RS, Bacon BR. Ascorbate-stimulated lipid peroxidation in human brain is dependent on iron but not on hydroxyl radical. *J Neurochem* 1990; 67: 717-722.

Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 1938; 22: 79-89.

Anton PA, Targan SR, Vigna SR, Durham M, Schwabe AD, Shanahan F. Enhanced neutrophil chemiluminescence in familial Mediterranean fever. *J Clin Immunol* 1988; 8: 148-156.

Aoyagi T, Tobe H, Kojima F, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced in actinomycetes. *Circ Res* 1984; 46: 1118-1127.

Aracava Y, Fróes-Ferrão MM, Pereira EFR, Albuquerque EX. Sensitivity of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and nicotinic acetylcholine receptors to ethanol and pyrazole. *Ann NY Acad Sci* 1991; 625: 451-472.

Arendt T, Allen Y, Marchbanks RM, Schugens MM, Sinden J, Lantos PL, Gray JA. Cholinergic-rich system and memory in the rat, effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system *Neuroscience* 1989; 33: 435-462.

Arendt T, Allen Y, Sinden J, Schugens MM, Marchbanks RM, Lantos PL, Gray JA. Cholinergic-rich brain transplants reverse alcohol-induced memory deficits. *Nature* 1988a; 33: 435-462.

Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, para lysis agitans, and Korsakoff's disease. *Acta Neuropathol* 1983; 61: 101-108.

- Arendt T, Henning D, Gray JA, Marchbanks RM. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bull* 1988b; 21: 563-570.
- Arendt T, Marchbanks RM, Gray JA. Effects of prolonged ethanol consumption on cholinergic function on basal forebrain and memory. *Biochem Soc Trans* 1987; 15: 499-500.
- Aronin N, Chase K, Sagar SM, Sharp FR, Di Figlia M. N-methyl-D-aspartate receptor activation in the neostriatum increases *c-fos* and *fos*-related antigens selectively in medium-sized neurons. *Neuroscience* 1991; 44: 409-420.
- Ashton H. *Brain function and psychotropic drugs*. New York, Oxford University Press 1992.
- Ashton H. *Brain systems, disorders and psychotropic drugs*. Oxford University Press 1993.
- Asman B, Bergstrom K, Wijkander P, Lockowandt B. Peripheral PMN cell activity in relation to treatment of juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1988; 96: 418-420.
- Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Rad Biol Med* 1985; 1: 3-25.
- Austen BM, Smyth DG, Snell CR.  $\gamma$  endorphin,  $\alpha$  endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment. *Nature* 1977; 269: 619-621.
- Azaryan A, Galoyan A. Human and bovine brain cathepsin L and cathepsin H: purification, physico-chemical properties, and specificity. *Neurochem Res* 1987; 12: 207-213.
- Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and ageing? *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 523-539.
- Barclay RK, Phillips MA. Inhibition of enkephalin-degrading aminopeptidase activity by certain peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 1732-1738.
- Barclay RK, Phillips MA. Inhibition of the enzymatic degradation of Leu-enkephalin by puromycin. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81: 1119-1123.
- Barnes DE, Walker DW. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res* 1981; 227: 333-340.
- Barnett NW, Francis PS, Lewis SW, Lim KF. Determination of a, 4-dihydroxy-3-methoxybenzeneacetic acid (vanilmandelic acid) by flow injection analysis coupled with luminol-hexacyanoferrate (III) chemiluminescence detection. *Anal Commun* 1999; 36: 131-134.

Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* 1986; 237: 935.

Barrett AJ, Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318: 247-250.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes*. Londres, Academic Press 1998.

Barry JA, Gawrish K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1994; 33: 8082-8088.

Bartus RT, Fleming D, Johnson HR. Aging in the rhesus monkey, debilitating effects on short-term memory. *J Geront* 1978; 33: 858-871.

Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem* 1981; 224: 387-396.

Bauer K, Nowak P. Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 1979; 99: 239-246.

Bauer K, Nowak P, Kleinkauf H. Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 1981; 99: 173-176.

Bausback HH, Ward PE. Degradation of low-molecular-weight opioid peptides by vascular plasma membrane aminopeptidase M. *Biochim Biophys Acta* 1986; 882: 437-444.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness?. *Ann Neurol* 1992; 31: 119-130.

Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?. *TINS* 1993; 16: 125-131.

Beal MF, Kowall NW, Swartz KJ, Ferrante RJ, Martin JB. Systemic approaches to modifying quinolenic acid striatal lesions in rats. *J Neurosci* 1988; 8: 3901-3908.

Beck CS, Hasinoff CW, Smith ME. L-alanyl- $\beta$ -naphthylamidase in rat spinal cord myelin. *J Neurochem* 1968; 15: 1297-1301.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624.

Behal FJ, Klein RA, Dawson FB. Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. *Arch Biochem Biophys* 1966; 115: 545-554.

Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 944-950.

Benedetti A, Esterbauer H, Ferrali M, Fulceri R, Comparsi M. Evidence for aldehydes bound to liver microsomal protein following CCl<sub>4</sub> or BrCCl<sub>3</sub> poisoning. *Biochim Biophys Acta* 1982; 711: 345-356

Benvenga MJ, Spaulding TC. Amnesic effect of the novel anticonvulsant (+)-MK-801. *Pharmac Biochem Behav* 1988; 30: 205-207.

Benzi G, Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 77-101.

Beracohea D, Durkin TP, Jaffard R. On the involvement of the central cholinergic system in memory deficits induced by long-term ethanol consumption in mice. *Pharmac Biochem Behav* 1986; 24: 519-524.

Beracohea D, Jaffard R. Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice, an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 1985; 15: 15-25.

Beracohea D, Lescaudron T, Tako A, Verna A, Jaffard R. Build-up and release from proactive interference during chronic ethanol consumption in mice, a behavioral and neuroanatomical study. *Behav Brain Res* 1987; 25: 63-74.

Beracohea D, Micheau J, Jaffard R. Memory deficits following chronic alcohol consumption in mice, relationships with hippocampal and cortical cholinergic activities. *Pharmac Biochem Behav* 1992; 42: 749-753.

Berg MJ, Marks N. Formation of desTyr dynorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain. *J Neurosci Res* 1984; 11: 313-321.

Bergman H, Borg S, Hindmarsh T, Idestrom CM, Mutzell S. Computed tomography of the brain and neuropsychological assesment of male alcoholic patients and a random sample from the general male population. *Acta Psychiatr Scand* 1980; 62: 77-88.

Bernath S. Ca<sup>2+</sup>-independent release of amino acid neurotransmitters: Factor or artifact?. *Prog Neurobiol* 1992; 38: 57-91.

Berretta N, Jones RS. Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience* 1996; 75: 339-344.

Berry DJ, Clark PM, Price CP. A laboratory and clinical evaluation of an immunochemiluminometric assay of thyrotropin in serum. *Clin Chem* 1988; 34: 2087-2090.

Bhave SV, Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol sensitivity of NMDA receptor function in developing cerebellar granule neurons: relationship to NMDA receptor subunit expression. *Eur J Pharmacol* 1999; 369: 247-259.

Bindoff AL, Birch-Machin MA, Cartledge NEF, Parker WD Jr, Turnbull DM. Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1991; 104: 203-208.

Bird RP, Draper HH. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymology* 1990; 105: 299-305.

Bird RP, Hung SSO, Hadley M, Draper HH. Determination of malonaldehyde in tissues by high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983; 128: 240-244.

Bjorklund A, Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. En: *Handbook of chemical neuroanatomy: classical neurotransmitters in the CNS*. Bjorklund A, Hokfelt T (eds). Amsterdam, Elsevier Science 1984; 55-122.

Blaustein MP. Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals *in vitro*. *J Physiol* 1975; 247: 617-655.

Blaustein MP, Goldring JM. Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J Physiol* 1975; 247: 589-615.

Blaustein MP, Ratzlaff RW, Schweitzer ES. Control of intracellular calcium in presynaptic nerve terminals. *Fed Proc* 1980; 39: 2790-2795.

Blitzer RD, Gil O, Landau EM. Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain Res* 1990; 537: 203-208.

Blum K, Briggs AH, Trachtenberg MC. Ethanol ingestive behaviour as a function of central neurotransmission. *Experientia* 1989; 45: 444-452.

Bogdanov MB, Wurtman RJ. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. *Neurosci Lett* 1997; 221: 197-201.

- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Lond JM, Clark JB, Heales SJ. Nitric oxide mediated mitochondrial damage in the brain. Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1997; 68: 2227-2240.
- Bondy SC, Guo SX. Regional selectivity in ethanol-induced pro-oxidant events within the brain. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 69-72.
- Bono G, Balducci C, Richelmi P, Koob GF, Pulvirenti L. Dopamine partial receptor agonists reduce ethanol intake in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996; 296: 233-238.
- Bonthius DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 107-118.
- Bora PS, Lange LG. Molecular mechanism of ethanol metabolism by human brain to fatty acid ethyl esters. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 28-30.
- Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR. 3 nitropropionic acid animal model and huntingtons disease. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 289-293.
- Bors W, Saran M, Tait D. Oxygen radicals in chemistry and biology. Berlin, de Gruyter 1984.
- Bouchenafa O, Littelton JM. Increased expression of *c-fos* in rat brain regions during ethanol withdrawal. *Alcohol Alcohol* 1993; 28: 224-230.
- Bouvier M, Szatkowski M, Amato A, Attwell D. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* 1992; 360: 471-474.
- Bowden SC. Separating cognitive impairment in neurologically asymptomatic alcoholism from Wernicke-Korsakoff syndrome: is the neuropsychological distinction justified?. *Psychol Bull* 1990; 107: 355-366.
- Bowman WC, Rand MJ. Textbook of pharmacology. Londres, Blackwell Scientific Publications 1980.
- Bradford HF. El sinaptosoma: un modelo *in vitro* de la sinapsis. En: Fundamentos de neuroquímica. Barcelona, Editorial Labor 1988; 299-337.
- Bradford HF. Isolated nerve terminals as an *in vitro* preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release. En: Handbook of psychopharmacology. Iversen LL, Iversen SW, Snyder SH (eds). New York, Plenum Press 1975; 191-252.
- Bradford HF. Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: release of amino acids. *Brain Res* 1970; 19: 239-247.

Bradford HF. Respiration *in vitro* of synaptosomes from mammalian cerebral cortex. J Neurochem 1969; 16: 675-684.

Bradford HF, Brownlow EK, Gammack DB. The distribution of cation-stimulated adenosine triphosphate in subcellular fractions from bovine cerebral cortex. J Neurochem 1969; 13: 1283-1297.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

Bradley PB, Engel G, Fenink W, Fozard JR, Humphrey PPA, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5HT. Neuropharmacology 1986; 25: 563-576.

Brecher AS. The distribution and activity of calf brain peptidases. J Neurochem 1963; 10: 1-6.

Brecher AS, Suszkiw JB. Purification and characterization of the soluble bovine enzyme. Biochem J 1969; 112: 335-342.

Brecher AS, Stauffer R, Knight J. Acetaldehyde inhibits serum aminopeptidases. Alcohol 1996; 13: 125-131.

Brennan WA, Bird ED, Aprile JR. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. J Neurochem 1985; 44: 1948-1950.

Briley EM, Lolait SJ, Axelrod J, Felder CC. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. Neuropeptides 1994; 27: 63-74.

Bristow LJ, Huston PH, Thorn L, Trickleband MD. The glycine/NMDA receptor antagonist, R-(+)-HA-966, blocks activation of the mesolimbic dopaminergic system induced by phencyclidine and dizolcipine (MK-801) in rodents. Br J Pharmac 1993; 108: 1156-1163.

Britán M, Kalant H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. Pharmac Biochem Behav 1991; 39: 917-922.

Brockhoff H, Zingoni J, Brockhoff S. Mechanism of anesthesia: anesthetics may restructure the hydrogen belts of membranes. Neurochem Int 1990; 17: 15-19.

Brodie MS, Shefner SA, Dunwiddie TV. Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat. Brain Res 1990; 508: 65-69.

Brodmann, K. Vergleichende localisationslehre der grobhirnrinde in ihren prinzipien dargestellt anf grund des zellenbaus. J A Barth Leipzig 1909.

Browne P, O'Cuinn G. An evaluation of the role of a pyroglutamate aminopeptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain in the degradation of thyroliberin in vitro. Eur J Biochem 1983; 137: 75-87.

Brozoski T, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. Science 1979; 205: 929-931.

Bucher T, Redetzki H. Eine spezifische photometrische bestimmung von athlalkohol anf fermentaviven wege. Klin Wochenschr 1951; 29: 615.

Buckholtz NS, Zhou DF, Tabakoff B. Ethanol does not affect serotonin receptor binding in rodent brain. Alcohol 1989; 6: 227-280.

Burov Iu V, Iukhananov RIu, Maiskii AI. Effect of ethanol on the concentration of enkephalins in the brain of rats with different levels of alcoholic motivation. Biull Eksp Biol Med 1983; 96: 48-51.

Bustos GA, Abarca J, Forray MI, Gysling K, Bradberry CW, Roth RH. Regulation of excitatory amino acid release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum: *in vivo* microdialysis stuies. Brain Res 1992; 585: 105-115.

Butterworth RF. Pathophysiology of alcoholic brain damage synergistic effects of ethanol, thiamine deficiency and alcoholic liver disease. Metab Brain Dis 1995; 10: 1-8.

Cala LA, Jones B, Mastaglia FL, Wiley B. Brain atrophy and intellectual impairment in heavy drinkers, a clinical psychometric and computerized tomographic study. Aust NZ J Med 1978; 8: 147-153.

Camargo ACM, Ramalho-Pinto FJ, Greene LJ. Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. J Neurochem 1972; 19: 37-49.

Campbell K, Kalen P, Lundberg C, Wictorin K, Rosengren E, Björklund A. Extracellular  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in the rat caudate-putamen: Monitoring the neuronal and glial contribution by intracerebral microdialysis. Brain Res 1993; 614: 241-250.

Campbell AD, McBride WJ. Serotonin-3 receptor and ethanol stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. Pharmac Biochem Behav 1995; 51: 835-842.

Canda A, Yu BH, Sze PY. Biochemical characterization of ethanol actions on dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1711-1718.

Carboni S, Isola R, Gessa GL, Rossetti ZL. Ethanol prevents the glutamate release induced by N-methyl-D-aspartate in the rat striatum. *Neurosci Lett* 1993; 152: 133-136.

Carboni E, Acquas E, Frau R, Di Chiara G. Differential inhibitory effects of a 5-HT<sub>3</sub> antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol* 1989; 164: 515-519.

Carlen PL, Wilkinson DA. Reversibility of alcohol-related brain damage: Clinical and experimental observations. *Acta Med Scand.* 1987; 222: 19-26.

Carlen PL, Wilkinson DA, Wortzman G, Holgate R, Cordingley J, Lee MA, Huszar L, Moddel G, Singh R, Kiraly L, Rankin JG. Cerebral atrophy and functional deficits in alcoholics without clinically apparent liver disease. *Neurology* 1981; 31: 377-385.

Carlezon WA, Mendrek JR, Wise RA. MK-801 disrupt the expression but not the development of bromocriptine sensitization: A state-dependency interpretation. *Synapse* 1995; 20: 1-9.

Carlsson A, Adolfsson R, Aquilonius SM, Gottfries CG, Oreland L, Svennerholm L, Winblad B. Biogenic amines in human brain in normal aging, senile dementia and chronic alcoholism. En: *Ergot compounds and brain function. Neuroendocrine and neuropsychiatric aspects.* Goldstein M, Liebermann A, Calne DB, Thorner MO (eds). New York; Raven Press 1980; 295-304.

Carlsson A. Perspectives on the discovery of monoaminergic neurotransmission. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10: 19-40.

Carlsson A, Lindqvist M. Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain *in vivo*. *J Pharm Pharmacol* 1973; 25: 437-440.

Carlsson A, Magnusson T, Svensson TH, Waldeck B. Effect of ethanol on the metabolism of brain catecholamines. *Psychopharmacol* 1973; 30: 27-36.

Carvalho AP. *Handbook of Neurochemistry.* Lajtha A (ed). New York, Plenum Press 1983; 69-119.

Carvey PM. *Drug action in the CNS.* New York, Oxford University Press 1998.

- Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: Evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 1994; 14: 3106-3121.
- Cederbaum AI, Dicker E, Lieber CS, Rubin E. Factors contributing to the adaptative increase in ethanol metabolism due to chronic consumption of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1977; 1: 27-31.
- Celentano JJ, Gibbs TT, Farb DH. Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res* 1988; 455: 377-380.
- Cerami A. Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 626-634.
- Cervera J, Levine RL. Modulation of the hydrophobicity of glutamine synthetase by mixed-function oxidation. *FASEB J* 1988; 2: 2591-2595.
- Chan HWS. Autoxidation of unsaturated lipids. Londres, Academic Press 1987.
- Chan PH, Fishman RA, Longar S, Chen S, Yu A. Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemia and injury. *Prog Brain Res* 1985; 63: 227-235.
- Chan WWC, Demmer W, Brand K. Some properties of aminopeptidase associated with rat brain cortical synaptosomes. *Can J Biochem Cell Biol* 1983; 61: 1185-1190.
- Chandler LJ, Newsom H, Summers C, Crews F. Chronic ethanol exposure potentiates NMDA excitotoxicity in cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 1993a; 60: 1578-1581.
- Chandler LJ, Summers C, Crews F. Ethanol inhibits receptor mediated excitotoxicity in rat primary neuronal cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 1993b; 17: 54-60.
- Chansel D, Czekalski S, Vandermeersch S, Ruffet E, Fournie-Zaluski MC, Ardaillou R. Characterization of angiotensin IV degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: 535-542.
- Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABA(A) receptor alpha1 and alpha3 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J Neurochem* 1997; 68: 121-127.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.

Chen X, Michaelis MR, Michaelis EK. Effects of chronic ethanol treatment on the expression of calcium transport carriers and NMDA/glutamate receptor proteins in brain synaptic membranes. *J Neurochem* 1997; 69: 1559-1569.

Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 1971; 242: 190-193.

Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 1986; 314: 1670-1676.

Chin JH, Goldstein DB. Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. *Mol Pharmacol* 1981; 19: 425-431.

Chiou SJ, Ma SM, Kamaya H, Ueda I. Anesthesia cutoff phenomenon: interfacial hydrogen bonding. *Science* 1990; 248: 583-585.

Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 1988a; 11: 465-469.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-1276.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988b; 1: 625-634.

Choi DW, Hartley DM. Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. En: *Molecular and cellular approaches to the treatment of neurological disease*. Waxman SG (ed). New York, Editorial Raven Press 1993; 23-34.

Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357-368.

Chopp M, Helpers JA, Ewing JR, Welch KM. Anoxia followed by hyperoxia: *in vivo* 31-P NMR of cat brain. *Mag Reson Imaging* 1984; 2: 329-333.

Churchill L, Bausback HH, Gerritsen ME, Ward PE. Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M. *Biochim Biophys Acta* 1987; 923: 35-41.

Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 53-57.

Clark AJ. *Applied Pharmacology*. Londres, J & A Churchill Ltd. 1942.

Clark JB, Bates TE, Almeida A, Cullingford T, Worwick J. Energy metabolism in the developing mammalian brain. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 980-983.

- Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *New Engl J Med.* 1978; 298: 1063-1067.
- Clemens JA, Ho PPK, Panetta JA. LY178002 reduces rat brain damage after transient global forebrain ischemia. *Stroke* 1991; 22: 1048-1052.
- Cloninger CR. Neurogenetic and adaptative mechanism in alcoholism. *Science* 1987; 236: 410-416.
- Coble BI, Briheim G, Dahlgren C, Molin L. Function of exudate neutrophils from skin in psoriasis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 85: 398-403.
- Coffey JW, De Duve C. Digestive activity of lysosomes. *J Biol Chem* 1968; 243: 3255-3263.
- Cole AJ, Saffen DW, Barban JM, Worley PR. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 1989; 340: 474-476.
- Coles CD, Brown RT, Smith IE, Platzman KA, Erickson S, Falek A. Effects of prenatal alcohol exposure at school age. I. Physical and cognitive development. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13: 357-367.
- Collingridge GL, Lester RAJ. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 1989; 41: 143-210.
- Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trens Pharmac* 1990; 11: 290-296.
- Collins MA. A possible neurochemical mechanism for brain and nerve damage associated with chronic alcoholism. *Trens Pharmac Sci* 1982; 3: 373-375.
- Collins GG, Anson J, Surtees L. Presynaptic kainate and N-methyl-D-aspartate receptors regulate excitatory amino acid release in the olfactory cortex. *Brain Res* 1983; 265: 157-159.
- Collins MA, Corso TD, Neafsey EJ. Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 284-292.
- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53: 599-623.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advance age. *Nat Genet* 1992; 2: 324-329.

Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6927-6933.

Cortot A, Jobin G, Ducrot F, Aymes C, Giraudeau V, Modigliani R. Gastric emptying and gastrointestinal absorption of alcohol ingested with a meal. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 343-348.

Costall B, Naylor RJ, Tyers MB. The psychopharmacology of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 181-202.

Cotman CW, Monaghan DT. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci* 1988; 11: 61-80.

Cotman CW, Taylor DA. Autoradiographic analysis of protein synthesis in synaptosomal fractions. *Brain Res* 1971; 29: 366-372.

Coyle JT. Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 1983; 41: 1-11.

Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-695.

Crabb DW, Bosron WF, Li TK. Steady-state kinetic properties of purified rat liver alcohol dehydrogenase: Application to predicting alcohol elimination rates in vivo. *Arch Biochem Biophys* 1983; 224: 299-309.

Cragg BG. The development of synapses in the visual system of the cat. *J Comp Neurol* 1975; 160: 147-166.

Crews F, Chandler LJ. Excitotoxicity and the neuropathology of ethanol. En: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (eds). Rockville, NIH 1993; 355-371.

Cross CE. Oxygen radicals and human disease. *Ann Inter Med* 1987; 107: 526-546.

Crossland J. *Lewis' Pharmacology*. Londres, Churchill Livingstone 1980.

Csillag A, Hajos F. Potassium movements in relation to synaptosomal morphology. *J Neurochem* 1980; 34: 495-503.

Cullen KM, Halliday GM. Mechanisms of cell death in cholinergic basal forebrain neurons in chronic alcoholics. *Met Brain Dis* 1995; 10: 81-91.

Cummins PM, O'Connor B. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochem Biophys acta* 1998; 1429: 1-17.

- Cunningham CL, Niehus DR, Malon DH, Prather LK. Genetic differences in the tewarding and activating effects of morphine and ethanol. *Psychopharmacology* 1992; 107: 385-393.
- Curran T, Morgan JI. Superinduction of *c-fos* by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* 1985; 229: 1265-1268.
- Danysz W, Archer T. Glutamate, learning and dementia-selection of evidence. *Amino Acids* 1994; 7: 61-80.
- Danysz W, Janowska E, Glazewsky S, Kostowsky W. The involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 499-504.
- Danysz W, Zajaczkowski W, Parsons CG. Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmac* 1995; 6: 455-474.
- Darden JH, Hunt WA. Reduction of striatal dopamine release during an ethanol withdrawal syndrome. *J Neurochem* 1977; 29: 1143-1145.
- Davidson M, Matsumoto I, Shanley B, Wilce PA. FOS and JUN as markers for ethanol-sensitive pathways in the rat brain. *Brain Res Bull* 1996; 39: 177-184.
- Davidson M, Shanley B, Wilce PA. Increased NMDA-induced excitability during ethanol withdrawal: a behavioral and histological study. *Brain Res* 1995; 674: 91-96.
- Davies KJA. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Free Radic Biol* 1986; 2: 155-173.
- Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895-9901.
- Davila MD, Shear PK, Lane B, Sullivan EV, Pfefferbaum A. A mammillary body and cerebellar shrinkage in chronic alcoholics: an MRI and neuropsychological study. *Neuropsychology* 1994; 8: 433-444.
- Davis DR, Anderton BH, Brion JP, Reynolds CH, Hanger DP. Oxidative stress induces dephosphorylation of Tau in rat-brain primary neuronal cultures. *J Neurochem* 1997; 68: 1590-1597.
- Davis JB. Oxidative mechanisms in beta amyloid cytotoxicity. *Neurodegeneration* 1996; 5: 441-444.
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; 32: 297-311.

Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. *Progr Brain Res* 1994; 103: 365-369.

De Belleruche JJ, Bradford HF. The stimulus-induced release of acetylcholine from synaptosome beds and its calcium dependence. *J Neurochem* 1972; 19: 1817-1819.

De Belleruche JJ, Bradford HF. The synaptosome: An isolated working neuronal compartment. En: *Progress in neurobiology*. Oxford, Pergamon Press 1973; 275-298.

De Gasparo M, Botta S, Leven NR. Characteristics of Ang II receptors and their role in cell and organ physiology. En: *Hypertension: Physiology, diagnosis and management*. Larag JH, Brenner BB (eds). New York, Raven Press 1994; 101-119.

De Gortari P, Fernández-Guardiola A, Martínez A, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res* 1995; 679: 144-150.

De Jersey J, Treolar T. Biosynthesis and possible pathological significance of fatty acid ethyl esters. *Alcohol* 1994; 2: 171-176.

De la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol* 1988; 45: 990-992.

De Robertis E, De Iraldi AP, Rodriguez GR, Salganicoff L. Cholinergic and non cholinergic nerve endings in rat brain. I. Isolation and subcellular distribution of acetylcholine and cetyl cholinesterase. *J Neurochem* 1962; 9: 23-35.

Deitrich RA, Dunwiddie TV, Harris RA, Erwin VG. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmac Rev* 1989; 41: 489-537.

Deitrich RA, Erwin VG. *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Londres, CRC Press 1995.

Delaunoy JP, Hog F, De Feudis FV, Mandel P. Estimation of glial contamination of synaptosomal-mitochondrial fractions of rat brain by radioimmunoassay of carbonic anhydrase (CAIII). *J Neurochem* 1979; 33: 611-612.

Devaud LL, Fritschy JM, Sieghart W, Morrow AL. Bidirectional alterations of GABA(A) receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Neurochem* 1997; 69: 126-130.

Devaud LL, Smith FD, Grayson DR, Morrow AL. Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of gamma-aminobutyric acid A receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 861-868.

Dexter DT, Jenner P, Schapira AHV, Marsden CD. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Ann Neurol* 1992; 32: S94-S100.

Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52: 1830-1836.

Di Monte DA, Chan P, Sandy MS. Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage. *Ann Neurol* 1992; 32: S111-S115.

Diamond I, Fishman RA. Development of glucose oxidation in isolated nerve endings. *Nature* 1973; 243: 519-520.

Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 1997; 77: 1-20.

Diana M, Pistis M, Muntoni A, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL. Profound decrement of dopaminergic activity during alcohol withdrawal: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7966-7969.

Diana M, Pistis M, Muntoni A, Gessa GL. Ethanol withdrawal does not induce a reduction in the number of spontaneously active dopamine neurons. *Brain Res* 1995; 682: 29-34.

Diana M, Pistis M, Muntoni A, Rossetti ZL, Gessa GL. Marked decrease of A10 dopamine neuronal firing during ethanol withdrawal syndrome in rats. *Eur J Pharmacol* 1992a; 221: 403-104.

Diana M, Rossetti ZL, Gessa GL. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of mesolimbic dopamine system in rats. *Alcohol* 1992b; 27: 329-334.

Diaz J, Samson HH. Impaired brain growth in neonatal rat pups exposed to ethanol. *Science* 1980; 208: 213-222.

Dichter MA, Choi DW. Excitatory amino acid neurotransmitter and excitotoxins. *Curr Neurol Neurobiol* 1989; 9: 1-26.

Dickinson R, Franks NP, Lieb WR. Thermodynamics of anesthetic/protein interaction. Temperature studies on firefly luciferase. *Biophys J* 1993; 64: 1254-1271.

Dildy-Mayfield JE, Harris RA. Activation of protein kinase C inhibits kainate-induced currents in oocytes expressing glutamate receptor subunits. *J Neurochem* 1994; 62: 1639-1642.

Dildy-Mayfield JE, Harris RA. Ethanol inhibits kainate responses of glutamate receptors expressed in *Xenopus* oocytes: role of calcium and protein kinase C. *J Neurosci* 1995; 15: 3162-3171.

Dildy-Mayfield JE, Leslie SW. Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in free intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by ethanol. *J Neurochem* 1991; 56: 1536-1543.

Dingledine R, Hynes MA, King GL. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the hippocampal slice. *J Physiol* 1986; 380: 175-189.

Dodd PR, Beckmann AM, Davidson MS, Wilce PA. Glutamate-mediated transmission, alcohol and alcoholism. *Neurochem Int* 2000; 37: 509-533.

Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminiscence as a diagnostic tool. A review. *Talanta* 2000; 51: 415-439.

Dohmen K, Baraona E, Ishibashi H, Pozzato G, Moretti M, Matsunaga C, Fujimoto K, Lieber CS. Ethnic differences in gastric  $\sigma$ -alcohol dehydrogenase activity and ethanol first-pass metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1569-1576.

Dolan RJ, Fletcher P, Frith CD, Friston KJ, Frackowiak RS, Crasby PM. Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Nature* 1995; 378: 180-182.

Dragunow M, Faull R. The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth* 1989; 29: 261-265.

Dragunow M, Robertson HA. Kindling stimulation induces *c-fos* protein(s) in granule cells of the dentate gyrus. *Nature* 1987; 329: 441-442.

Drapier JC, Hibbs JB. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; 140: 2829-2838.

Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 1985; 45: 145-151.

Driscoll CD, Streissguth AP, Riley EP. Prenatal alcohol exposure: Comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12: 231-237.

- Druhan JP, Rajaby H, Stewart J. MK-801 increases locomotor activity without elevating extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Synapse* 1996; 24: 135-146.
- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin JP, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic-acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 1988; 336: 68-70.
- Dunwiddie TV, Abbracchio MP, Bischofberger N, Brundege JM, Buell G, *et al.* Purinoceptors in the central nervous system. *Drug Dev Res* 1996; 39: 361-370.
- Dupont A, Cusan L, Garon M, Alvarado-Urbina G. Extremely rapid degradation of [<sup>3</sup>H] methionine-enkephalin by various rat tissues *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci* 1977; 21: 907-914.
- Durand D, Carlen PL. Decreased neuronal inhibition *in vitro* after long-term administration of ethanol. *Science* 1984a; 224: 1359-1361.
- Durand D, Carlen PL. Impairment of long-term potentiation in rat hippocampus following chronic ethanol treatment. *Brain Res* 1984b; 308: 325-332.
- Eckardt MJ, File SF, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol clin Exp Res* 1998; 22: 998-1040.
- Eckardt MJ, Martin PR. Clinical assessment of cognition in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 123-127.
- Eckardt MJ, Stapleton JM, Rawlings RR, Davis EZ, Grodin DM. Neuropsychological functioning in detoxified alcoholics between 18 and 35 years of age. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 53-59.
- Edmondson HA, Hall EM, Myers RD. Pathology of alcoholism. En: *Alcoholism*. Thompson GN (ed). Springfield, Charles C Thomas 1956; 233-290.
- Edwards B, Sparks A, Voyta JC, Bronstein I. Unusual luminescent properties of odd- and even-substituted naphthyl-derivatized dioxetanes. *J Biolumin Chemilumin* 1990; 5: 1-4.
- Eichenbaum H, Clegg RA, Feeley A. Reexamination of functional subdivision of the rodent prefrontal cortex. *Exp Neurol* 1983; 79: 434-451.
- Eikelboom R, Stewart J. Conditioning off drug-induced physiological responses. *Psychol Rev* 1982; 89: 507-528.
- Ekins R, Chu F, Micallef J. High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and 'multi-analyte' immunoassays. *J Biolumin, Chemilumin* 1989; 4: 59-78.

Ellis S. A thiol-activated aminopeptidase of the pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 1963; 12: 452-456.

Ellis S, Perry M. Pituitary arylamidases and peptidases. *J Biol Chem* 1966; 241: 3679-3686.

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G. Further characterization of the substrate specificity of TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 1990; 15: 31-36.

Erecinska M, Nelson D, Deas J, Silver IA. Limitation of glycolysis by hexokinase in rat brain synaptosomes during intense ion pumping. *Brain Res* 1996; 716: 153-159.

Erecinska M, Silver IA. ATP and brain function. *J Cerebr Blood Flow Metab* 1989; 9: 2-19.

Erickson CK. Review of neurotransmitters and their role in alcoholism treatment. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 5-11.

Erickson CK, Javors MA, Morgan WW. Drug dependence: defining the issues. En: *Addiction potential of abused drugs and drug classes*. Stimmel B (ed). New York, Haworth Press 1990; 1-7.

Eskay RL, Chautard T, Torda D, Hwang D. The effects of alcohol on selected regulatory aspects of stress axis. En: *Alcohol and regulatory system*. Zakhari S (ed). Bethesda, NIH 1993; 3-19.

Esteban MJ, Peinado JM, Martínez JM, Iribar MC. Aged related changes on acidic aminopeptidase activity in the frontal cortex of the rat. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Neuroscience Association in association with the 5<sup>th</sup> Meeting of the Sociedad Española de Neurociencias, Madrid 1993.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.

Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J* 1982; 208: 129-140.

Esterbauer H, Lang J, Zadavec S, Slater TF. Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1984; 105: 319-328.

Esterbauer H, Slater TF. The quantitative estimation by high performance liquid chromatography of free malondialdehyde produced by peroxidizing microsomes. *IRCS Med Sci* 1981; 9: 749-750.

- Esterbauer H, Zollner H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 197-203.
- Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *Atlas Sci Biochem* 1988; 1: 311-315.
- Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993; 49: 577-587.
- Eyring H, Woodbury JW, Dárrigo JS. A molecular mechanism of general anesthesia. *Anesthesiology* 1973; 38: 415-424.
- Fabricius M, Jensen LH, Lauritzen M. Microdialysis of interstitial aminoacids during spreading depression and anoxia depolarization in the rat neocortex. *Brain Res* 1993; 612: 61-69.
- Fadda F, Argiolas A, Melis MR, Serra G, Gessa GL. Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate and substantia nigra. *Life Sci* 1980; 27: 979-986.
- Fadda F, Colombo G, Gessa GL. Genetic sensitivity to effect of ethanol on dopaminergic system in alcohol preferring rats. *Alcohol Alcohol* 1991a; 1: 439-442.
- Fadda F, Garau B, Marchei F, Colombo G, Gessa GL. MDL 72222, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 1991b; 26: 107-110.
- Fadda F, Gessa GL. Role of dopamine in the CNS effect of ethanol. En: *Progress in alcohol research*. Parvez S, Burov Y, Parvez H, Burns E (eds). The Netherlands, VNU Science Press 1985; 147-161.
- Fadda F, Mosca E, Colombo G, Gessa GL. Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism. *Life Sci* 1989; 44: 281-287.
- Fadda F, Mosca E, Colombo G, Gessa GL. Voluntary ethanol consumption increases dopamine metabolism in the rat brain. En: *Biomedical and social aspects of alcohol and alcoholism*. Kuriyama K, Takada A, Ishii H (eds). Amsterdam, Elsevier Science 1988; 211-216.
- Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 385-431.
- Falkous G, Harris JB, Mantle D. Effect of neurotoxic metal ions *in vitro* on proteolytic enzyme activities in human cerebral cortex. *Clin Chim Acta* 1995; 238: 125-135.

Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L. Involvement of phospholipase A(2) in neurodegeneration. *Neurochem Int* 1997; 30: 517-522.

Favit A, Nicoletti F, Scapagnini U, Canonico PL. Ubiquinone protects cultured neurons against spontaneous and excitotoxin-induced degeneration. *J Cerebr Blood Flow Metab* 1992; 12: 638-645.

Felgenhauer K, Glenner GG. The enzymatic hydrolysis of aminoacid  $\beta$ -naphthylamidases. II. Partial purification and properties of a peptide-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 401-413.

Felix D, Harding JW. Manipulation of aminopeptidase activities: differential effects on iontophoretically applied angiotensins in rat brain. *J Hypertens* 1986; 4: S398-S341.

Fernández-Novoa L, Alvarez XA, Sempere JM, Miguel-Hidalgo JJ, Diaz J, Franco-Maside A, Cacabelos R. Effects of anapsos on the activity of the enzyme Cu-Zn-superoxide dismutase in an animal model of neuronal degeneration. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1997; 19: 99-106.

Ferrario CM, Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Diz DI. Counterregulatory actions of angiotensin (1-7). *Hypertension* 1997; 30: 535-541.

Fields R, Dixon HB. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Biochem J* 1971; 121: 587-589.

Fink K, Schultheiss R, Göthert M. Inhibition of N-methyl-D-aspartate- and kainate-evoked noradrenaline release in human cerebral cortex slices by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 345: 700-703.

Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler E. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 1996; 16: 274-282.

Floyd RA. Production of free radicals. En: *Primer in cerebrovascular disease*. Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Sresjo BK, Weir B (eds). San Diego, Academic Press 1997; 165-169.

Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32: S22-S27.

Folk JE. A new pancreatic carboxypeptidase. *J Am Chem Soc* 1956; 78: 3541-3542.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol-mediated upregulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide. *J Biol Chem* 1996; 271: 13297-13299.

- Fontana G, Blaustein MP. Calcium buffering and free  $\text{Ca}^{2+}$  in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 1993; 60: 843-850.
- Forman SA, Miller KW, Yellen G. A discrete site for general-anaesthetics on a postsynaptic receptor. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 574-581.
- Frandsen A, Schousboe A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci* 1990; 8: 209-216.
- Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general-anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-614.
- Franks NP, Lieb WR. Molecular mechanism of general anesthesia. *Nature* 1982; 300: 487-493.
- Franks NP, Lieb WR. Partitioning of long-chain alcohols into lipid bilayers: implications for mechanisms of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5116-5120.
- Franks NP, Lieb WR. Stereospecific effects of inhalation general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* 1991; 254: 427-430.
- Franks NP, Lieb WR. Where do general anesthetics act?. *Nature* 1978; 274: 339-342.
- Fredholm BB, Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release?. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 130-134.
- French ED, Ceci A. Non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists are potent activators of ventral tegmental A-10 dopamine neurons. *Neurosci Lett* 1990; 119: 159-162.
- French TA, Masserano JM, Weiner N. Influence of thyrotropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on the CNS ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 99-106.
- Freund G, Ballinger WE. Loss of muscarinic and benzodiazepine neuroreceptors from hippocampus of alcohol abusers. *Alcohol* 1989; 6: 23-21.
- Freund G. Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Ann Rev Pharmacol* 1973; 13: 217-227.
- Fried RC, Blaustein MP. Retrieval and recycling of synaptic vesicle membrane in pinched-off nerve terminals (synaptosomes). *J Cell Biol* 1978; 78: 685-700.
- Fried RC, Blaustein MP. Synaptic vesicle recycling in synaptosomes in vitro. *Nature* 1976; 261: 255-256.
-

Fried PA, O'Connell CM, Watkinson B. 60- and 72-month follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes, and alcohol: Cognitive and language assessment. *J Dev Behav Pediatr* 1992a; 13: 383-391.

Fried PA, Watkinson B. 12- and 24-month neurobehavioural follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes, and alcohol. *Neurotoxicol Teratol* 1988; 10: 305-313.

Fried PA, Watkinson B. 36- and 48-month neurobehavioral follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes, and alcohol. *J Dev Behav Pediatr* 1990; 11: 49-38.

Fried PA, Watkinson B, Gray R. A follow-up study of attentional behavior in 6-year-old children exposed prenatally to marijuana, cigarettes and alcohol. *Neurotoxicol Teratol*. 1992b; 14: 299-311.

Friedman JE, Haddad GG. Major differences in  $Ca^{2+}$  response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ . *J Neurosci* 1993; 13: 63-72.

Froehlich JC, Li TK. Opioid involvement in alcohol drinking. *Ann NY Acad Sci* 1994; 739: 156-167.

Frommel E, Seydoux J. De l'effet de l'éthanol sur l'encéphale. Bilan des tests dits de neuropharmacologie chez l'animal. *Helv Physiol Acta* 1964; 22: 34.

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M. On the proteolytic enzymes of animal tissues. II. The composite nature of beef spleen cathepsin. *J Biol Chem* 1941a; 138: 249-262.

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M. On the proteolytic enzymes of animal tissues. III. The proteolytic enzymes of beef spleen, beef kidney and swine kidney classification of the cathepsins. *J Biol Chem* 1941b; 141: 763-774.

Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1521-1525.

Fulop T Jr, Seres I. Age-related changes in signal transduction. Implications for neuronal transmission and potential for drug intervention. *Drugs Aging* 1994; 5: 366-390.

Gaddum JH. *Pharmacology*. Londres, Oxford University Press 1959.

Galpern WR, Matthews RT, Beal MF, Isacson O. NGF, Attenuates 3 nitrotyrosine formation in a 3 np model of Huntington's disease. *Neuroreport* 1996; 7: 2639-2642.

- Gambetti P, Autilio-Gambetti LA, Gonatas NK, Shafer B. Protein synthesis in synaptosomal fractions. Ultrastructural radioautographic study. *J Cell Biol* 1972; 52: 526-535.
- Ganong WF. Tissue renin-angiotensin system. *Adv Exp Med Biol* 1995; 377: 435-440.
- Ganong WF. What regulates the production and secretion of angiotensinogen in the brain? *Front Neuroendocrinol* 1994; 15: 78-81.
- García ML, Murray KD, García VB, Strehler EE, Isackson PJ. Seizure induced alterations of plasma membrane calcium-ATPase isoform 1, isoform 2 and isoform 3 messenger RNA and protein in rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1997; 45: 230-238.
- García-Muñoz M, Young SJ, Groves PM. Terminal excitability of the corticostriatal pathway. II. Regulation by glutamate receptor stimulation. *Brain Res* 1991; 551: 207-215.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS* 1991; 14: 60-67.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336: 385-388.
- Gasbarrini A, Pasini P, Nardo B, De Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, Roda E, Bernardi M, Roda A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 211-216.
- Gassen M, Youdim MBH. The potential role of iron chelators in the treatment of Parkinson's disease and related neurological disorders. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80: 159-166.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Brain Res* 1985; 248: 210-214.
- Gianoulakis C, Gupta A. Endorphins in inbred mice with variable sensitivity to ethanol: effect of acute ethanol treatment. *Neuropeptides* 1985; 5: 579-582.
- Gibson AM, Biggins JA, Lauffart B, Mantle D, McDermott JR. Human brain leucyl aminopeptidase: isolation, characterization and specificity against some neuropeptides. *Neuropeptides* 1991; 19: 163-168.
- Gibson AM, McDermott JR, Lauffart B, Mantle D. Specificity of action of human brain alanyl aminopeptidase on Leu-enkephalin and Dynorphin-related peptides. *Neuropeptides* 1989; 13: 259-262.

Gilman S, Adams K, Koeppe RA, Berent S, Kluin KJ, Modell JG, Kroll P, Brunberg JA. Cerebellar and frontal hypometabolism in alcoholic cerebellar degeneration studied with position emission tomography. *Ann Neurol* 1990; 28: 775-785.

Giri PR, Dave JR, Tabakoff B, Hoffman PL. Arginine vasopressin induces the expression of c-fos in the mouse septum and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 7: 131-137.

Giros B, Gros C, Solhonne B, Schwartz JC. Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met<sup>5</sup>)Enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies. *Mol Pharmacol* 1986; 29: 281-287.

Givens BS, Breese GR. Site-specific enhancement of  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition of neural activity by ethanol in the rat medial septal area. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 528-538.

Glenner GG, McMillan DJ, Folk JE. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal  $\alpha$ -L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 1962; 194: 867.

Gold MS, Miller NS. Seeking drugs/alcohol and avoiding withdrawal: the neuroanatomy of drive states and withdrawal. *Psychiatr Ann* 1992; 22: 430-435.

Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW. N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmac Exp Ther* 1987; 243: 784-791.

Goldman-Rakic PS. Circuitry of the prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational knowledge. En: *Handbook of physiology: The nervous system: higher cortical function*. Mountcastle VB, Plum F (eds). Bethesda, American Physiological Society 1987; 373-417.

Goldman-Rakic PS. Prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: the release of working memory. En: *Psychopathology and the brain*. Carroll BJ, Barrett JE (eds). New York, Raven Press 1991; 1-23.

Goldman-Rakic PS, Brown RM. Regional changes of monoamines in cerebral cortex and subcortical structures of aging rhesus monkeys. *Neuroscience* 1981; 6: 177-187.

Goldstein A, Aronow L, Kalman SM. Principles of drug action. The basis of pharmacology. Willey J, Sons (ed) New York 1974.

Gomori G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 87: 559-561.

Gonzales RA, Bungay PM, Kiianmaa K, Samsom HH, Rossetti ZL. *In vivo* links neurochemistry and behavioral effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 203A-205A.

Gonzales RA, Hoffman PL. Receptor gated channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends in Pharmac Sci* 1991; 12: 1-3.

Gonzales RA, Woodward JJ. Ethanol inhibits N-methyl-D-aspartate-stimulated [<sup>3</sup>H]norepinephrine release from rat cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 1138-1144.

Goodlett CR, Thomas JD, West JR. Long-term deficits in cerebellar growth and rotarod performance of rats following "binge-like" alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13: 69-74.

Gorenstein C, Snyder SH. Characterization of enkephalinases. En: *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Way EL (ed). New York, Pergamon Press 1980: 345-348.

Gotham AM, Brown RG, Marsden CD. Frontal cognitive function in patients with Parkinson's disease on and off levedopa. *Life Sci* 1988; 40: 1487-1497.

Göthert M, Fink K. Inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and L-glutamate-induced noradrenaline and acetylcholine release in the rat brain by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 340: 516-521.

Gotz ME, Freyberger A, Riederer P. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1990; 29: 241-249.

Grant KA. Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels. *Behav Pharmacol* 1994; 5: 383-404.

Grant KA, Hoffman PL, Tabakoff B. Neurobiological and behavioral approaches to tolerance and dependence. En: *The nature of drug dependence*. Edwards G, Lader M (eds). Oxford, Oxford University Press 1990a; 135-169.

Grant KA, Valverius P, Hudspith M, Tabakoff B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 1990b; 176: 289-296.

Gray EG, Whittaker VP. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscope study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 1962; 96: 79-88

Greeley J, Lê AD, Poulos CX, Cappel H. Alcohol is an effective cue in the conditional control of tolerance to alcohol. *Psychopharmacology* 1984; 83: 487-491.

Greenberg LJ. Fluorimetric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of  $10^{-14}$  moles. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 430-435.

Greene T, Ernhart CB, Ager J, Sokol RJ, Martier S, Boyd T. Prenatal alcohol exposure and cognitive development in the preschool years. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13: 57-68.

Greene T, Ernhart CB, Martier S, Sokol RJ, Ager J. Prenatal alcohol exposure and language development. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 937-945.

Grobin AC, Papadeas ST, Morrow AL. Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABAA receptor expression: Potential mechanisms. *Neurochem Int* 2000; 37: 453-461.

Grollman A, Grollman EF. *Pharmacology and Therapeutics*. Philadelphia, Lea & Febiger 1970.

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* 1985b; 24: 2179-2185.

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: identification of aminopeptidase M. *Neuropeptides* 1985a; 5: 485-488.

Guerri C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in the behavioral dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 304-324.

Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991; 547: 129-134.

Gursey D, Olson RE. Depression of serotoni and norepinephrine levels in brain stem of rabbit by ethanol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 104: 280-281.

Gustavsson L. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D. *Alcohol Alcohol* 1994; 30: 391-406.

Gutteridge JMC. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett* 1981; 128: 343-346.

Guyon A, Roques BP, Guyon F, Foucault A, Perdrisot R, Swerts JP, Schwartz JC. Further characterization and kinetics of appearance of hydrolysis products of Met-enkephalin. En: *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Way EL (ed). New York, Pergamon Press 1980; 349-352.

- Haddad GG, Jiang C. Mechanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: *in vitro* current and voltage clamp studies in the adult rat. *Brain Res* 1993; 625: 261-268.
- Hadjiconstantinou M, Rossetti ZL, Wemlinger TA, Neff NH. Dizolcipine enhances striatal tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activity. *Eur J Pharmacol* 1995; 289: 97-101.
- Hagan JJ, Salamone JD, Simpson J, Iversen SD, Morris RGM. Place navigation in rat is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 1988; 27: 9-20.
- Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res* 1975; 93: 485-489.
- Hakim AM. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann Neurol* 1984; 16: 673-679.
- Hakim AM, Pappius HM. Sequence of metabolic, clinical, and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann Neurol* 1983; 13: 365-375.
- Haklar G, Yegenaga L, Yalcin AS. Evaluation of oxidant stress in chronic hemodialysis patients: use of different parameters. *Clin Chim Acta* 1995; 234: 109-114.
- Hall ED. Novel inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation for neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 1992; 32: S137-S142.
- Hall ED, Lindholm EP. Organization and motor somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res* 1974; 66: 23-38.
- Halliday G, Cullen K, Harding A. Neurophatological correlates of memory dysfunction in the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol* 1994; 2: 247-253.
- Halliwell B. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurol Sci* 1992; 8: 22-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurol.Sci* 1985a; 8: 22-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxigen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.

Halliwell B, Guttridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 1985b; 8: 89-193.

Hambrook JM, Morgan BA, Rance MJ, Smith CFC. Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature* 1976; 262: 782-783.

Hannan AJ. Trinucleotide Repeat Expansions and Neurodegenerative Disease-A Mechanism of Pathogenesis. *Clin Exp Pharm Physiol* 1996; 23: 1015-1020.

Hansen AJ, Hounsgaard J, Jahnsen H. Anoxia increases potassium conductance in hippocampal nerve cells. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 301-310.

Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 1981; 113: 437-445.

Harding AJ, Baker KG, Harper CG, Kril JJ, Halliday GM. Cerebellar neuron loss in alcoholics. 18th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society. Canberra 1998.

Harding AJ, Halliday GM, Ng JLF, Harper CG, Kril JJ. Loss of vasopressin-immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. *Neuroscience* 1996; 72: 699-708.

Harper C. The neuropathology of alcohol-specific brain damage or does alcohol damage the brain?. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 101-110.

Harper CG. The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia. A neuropathological study of 131 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46: 593-98.

Harper CG, Blumbergs PC. Brain weights in alcoholics. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1982; 45: 593-598.

Harper CG, Butterworth R. Nutritional and metabolic disorders. En: Greenfield's neuropathology. Graham DI, Lantos PL (ed). Londres, Arnold 1997; 601-642.

Harper CG, Kril JJ. Brain atrophy in chronic alcoholic patients: A quantitative pathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 211-217.

Harper CG, Kril JJ. Corpus callosum thickness in alcoholics. *Brit J Addict* 1988; 83: 577-580.

Harper CG, Kril JJ, Holloway RL. Brain shrinkage in chronic alcoholics. A pathological study. *Br Med J* 1985; 290: 501-504.

Harris EW, Cotman CW. Effect of synaptic antagonists on perforant path paired-pulse plasticity: differentiation of pre- and post-synaptic antagonism. *Brain Res* 1985; 334: 348-353.

Harris RA, McQuilkin SJ, Paylor R, Abeliovich A, Tonegawa S, Wehner JM. Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3658-3662.

Hart RC, Taaffe LR. The use of acridinium ester-labelled streptavidin in immunoassays. *J Immunol Methods* 1987; 101: 91-96.

Hartnett KA, Stout AK, Rajdev S, Rosenberg PA, Reynolds IJ, Aizenman E. NMDA receptor mediated neurotoxicity. A paradoxical requirement for extracellular Mg<sup>2+</sup> in Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> free solutions in rat cortical neurons *in vitro*. *J Neurochem* 1997; 68: 1836-1845.

Hasebe T, Nagao J, Kawashima T. Simultaneous flow injection determination of acetylcholine and choline based on luminol chemiluminescence in a micellar system with on-line dialysis. *Anal Sci* 1997; 13: 93.

Hata T, Meyer JS, Tanahashi N, Ishikawa Y, Imai A, Shinohara T, Velez M, Fann WE, Kandula P, Sakai F. Three-dimensional mapping of local cerebral perfusion in alcoholic encephalopathy with and without Wernicke-Korsakoff syndrome. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 35-44.

Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 563-571.

Hayaishi O, Niki E, Kondo M, Yoshikawa T. Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals. Amsterdam, Elsevier, 1989.

Hayashi M. Monkey brain arylamidase II. Further characterization and studies on mode of hydrolysis of physiologically active peptides. *J Biochem* 1978; 84: 1363-1372.

Hayashi M, Oshima K. Purification and characterization of arylamidase from monkey brain. *J Biochem* 1977; 81: 631-639.

Hedin SG, Rowland S. Untersuchungen über das vorkommen von proteolytischen enzymen im thierkörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1901; 38: 531-540.

Henn FA, Anderson DJ, Rustard DG. Glial contamination of synaptosomal fractions. *Brain Res* 1976; 101: 341-344.

Hersh LB. Characterization of membrane-bound aminopeptidase from rat brain identification of the enkephalin-degrading aminopeptidase. *J Neurochem* 1985; 44: 1427-1435.

Hersh LB. Nomenclature for enkephalin degrading peptidases. *Life Sci* 1986; 38: 1151-1153.

Hersh LB, Aboukhair N, Watson S. Immunohistochemical localization of aminopeptidase M in rat brain and periphery: relationship of enzyme localization and enkephalin metabolism. *Peptides* 1987; 8: 523-532.

Hersh LB, McKelvy JF. An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J Neurochem* 1981; 36: 171-178.

Hersh LB, Smith TE, McKelvy JF. Cleavage of endorphins to des-Tyr endorphins by homogenous bovine brain aminopeptidase. *Nature* 1980; 286: 160-162.

Himmelsbach CK. The morphine abstinence syndrome, its nature and treatment. *Ann Int Med* 1941; 2: 829-843.

Hinson RE, Siegel S. The contribution of Pavlovian conditioning to ethanol tolerance and dependence. En: *Alcohol tolerance, dependence and addiction*. Rigter H, Crabbe J CJ (eds). Amsterdam, Elsevier 1980; 181-199.

Hodge CW, Chappelle AM, Samson HH. GABAergic transmission in the nucleus accumbens is involved in the termination of ethanol self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1486-1493.

Hodge CW, Samson HH, Lewis RS, Erickson HL. Specific decreases in ethanol- but not water-reinforced responding produced by the 5-HT<sub>3</sub> antagonist ICS 205-930. *Alcohol* 1993; 10: 191-196.

Hodges H, Allen Y, Sinden J, Mitchell SN, Arendt T, Lantos PL, Gray JA. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res* 1991; 43: 7-28.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem* 1989; 52: 1937-1940.

Hoffman PL, Tabakoff B. Centrally acting peptides and tolerance to ethanol. *Curr Alcohol* 1981; 8: 359-378.

Hoffman PL, Tabakoff B. Ethanol's action on brain biochemistry. En: Alcohol and the brain, chronic effects. Tarter RE, Van Thiel DH, Edwards KL (eds). New York, Plenum 1985; 19-68.

Hohle S, Spitznagel H, Rascher W, Culman J, Unger T. Angiotensin AT1 receptor mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. Eur J Pharmacol 1995; 275: 277-282.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci 1994; 17: 31-108.

Holzman C, Paneth N, Little R, Pinto-Martin J. Perinatal brain injury in premature infants born to mothers using alcohol in pregnancy. Pediatrics 1995; 95: 66-73.

Hondo H, Yonezawa Y, Nakahara T, Natkamura K, Hirano M, Uchimura H, Tashiro N. Effect of phencyclidine on dopamine release in the rat prefrontal cortex, an *in vivo* microdialysis study. Brain Res 1993; 633: 337-342.

Hopkinson CR, Hooper KC. Peptidase activity in the hypothalamus. Proc Biochem Soc 1970; 36P-37P.

Hopsu VK, Kantonen UM, Glenner GG. A peptidase from rat tissue selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. Life Sci 1964; 3: 1449-1453.

Hosie RJA. The localization of adenosine triphosphatases in morphologically characterized subcellular fractions of guinea-pig brain. Biochem J 1965; 96: 404-410.

Houser CR, Crawford GD, Barber RP, Salvaterra PM, Vaughn JE. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. Brain Res 1983; 266: 97-119.

Hovda DA, Yoshino A, Kawamata T, Becker DP. Diffuse prolonged depression of cerebral oxidative metabolism following concussive brain injury in the rat: a cytochrome oxidase histochemistry study. Brain Res 1991; 567: 1-10.

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme.html>

Hu XJ, Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. Mol Brain Res 1996; 36: 211-218.

Hu XJ, Ticku MK. Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons. Mol Brain Res 1995; 30: 347-356.

Huang YL, Li SY, Dremel BA, Bilitewski U, Schmid RD. On-line determination of glucose concentration throughout animal cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen peroxide coupled with flow-injection analysis. *J Biotechnol* 1991; 18: 161-172.

Hui KS, Gioannini T, Hui M, Simon EJ, Lajtha A. A opiate receptor-associated aminopeptidase that degrades enkephalins. *Neurochem Res* 1985; 10: 1047-1058.

Hui KS, Hui MPP, Lajtha A. Major rat brain membrane-associated and cytosolic enkephalin-degrading aminopeptidases: comparing studies. *J Neurosci Res* 1988; 20: 231-240.

Hui KS, Hui M, Lajtha A. Properties of a brain membrane aminoenkephalinase: inhibition studies. En: *Neural membranes*. Sun GY, Bazan N, Wu JY, Porcelatti G, Sun AY (eds). Clifton, The Humana Press 1983a; 375-393.

Hui KS, Lajtha A. Neuropeptidases. En: *Handbook of Neurochemistry*. Lajtha A (ed). New York, Plenum Publishing Corp. 1983; 1-9.

Hui KS, Saito M, Hui M. A novel neuron-specific aminopeptidase in rat brain synaptosomes. Its identification, purification and characterization. *J Biol Chem* 1998; 273: 31053-31060.

Hui KS, Wang YJ, Lajtha A. Purification and characterization of enkephalin aminopeptidase from rat brain membranes. *Biochemistry* 1983b; 22: 1062-1067.

Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain. A review. *Alcohol* 1996; 13: 147-151.

Hunt WA, Majchrowicz J. Alterations in the turnover of brain norepinephrine and dopamine in alcohol-dependent rats. *J Neurochem* 1974; 23: 549-552.

Hunter R, McLuskie R, Wyper D, Patterson J, Christie JE, Brooks DN, McCulloch, J, Fink G, Goodwin GM. The pattern of function-related regional cerebral blood flow investigated by single photon emission tomography with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO in patients with presenile Alzheimer's disease and Korsakoff's psychosis. *Psychol Med* 1989; 19: 847-855.

Hyytia P, Koob GF. GABA<sub>A</sub> receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 1995; 283: 151-159.

Imai K, Hama T, Kato T. Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem* 1983; 93: 431-437.

Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 219-239.

Imperato A, Scrocco MG, Angelucci L. NMDA receptors and *in vivo* dopamine release in the nucleus accumbens and caudatus. *Eur J Pharmac* 1990; 187: 555-556.

Iorio KR, Reinlib L, Tabakoff B, Hoffman PL. Chronic exposure to cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. *Mol Pharmac* 1992; 41: 1142-1148.

Iribar C, Esteban MJ, Martinez JM, Peinado JM. Decrease in cytosolic aspartyl-aminopeptidase but not in alanyl-aminopeptidase activity in the frontal cortex of the aged rat. *Brain Res* 1995; 687: 211-213.

Itoh C, Nagamatsu A. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243: 203-208.

Itoh Y, Ogasawara T, Yamazaki A, Ukai Y, Miura A, Kimura K. Enhancement of noradrenaline release from rat frontal cortex by thyrotropin-releasing hormone and its analog (3R, 6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinyl-carbonyl-L-histidyl-prolinamide, as studied by intracerebral microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 168: 255-261.

Iunuskhodzhaev E, Bazhanov NN, Vladimirov IuM, Sherstnev MP, Piriázev AP. A method for assessing the patient's clinical status and for predicting the clinical course of suppurative-inflammatory processes using chemiluminescence. *Stomatologiya* 1989; 68: 7-9.

Iwata H. Possible role of thiamine in the nervous system. *Trends Pharmac Sci* 1982; 3: 171-173.

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 267-273.

Jacobson RR, Acker CF, Lishman WA. Patterns of neuropsychological deficit in alcoholic Korsakoff's syndrome. *Psychol Med* 1990; 20: 321-334.

Jacobson JL, Jacobson SW. Prenatal alcohol exposure and neurobehavioral development: Where is the threshold? *Alcohol Health Res World* 1994; 18: 30-36.

Jacobson JL, Jacobson SW, O'Neill JM, Frankowski JJ, Bihun JT. Visual expectation and dimensions of infant information processing. *Child Dev* 1992; 63: 711-724.

Jacobson JL, Jacobson SW, Sokol RJ. Increased vulnerability to alcohol-related birth defects in the offspring of mother over 30. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 359-363.

Jacobson JL, Jacobson SW, Sokol RJ, Martier SS, Ager JW, Kaplan-Estrin MG. Teratogenic effects of alcohol on infant development. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 174-183.

Jacobson RR, Lishman WA. Cortical and diencephalic lesions in Korsakoff's syndrome, a clinical and CT scan study. *Psychol Med* 1990; 20: 63-75.

Jacoby M. Ueber die fermentative eiweisspaltung und ammoniakbildung in der leber. *Hope-Seyleis Z Physiol Chem* 1900; 30: 149-173.

Jansen EH, Van den Berg RH, Zomer G. Characteristics and detection principles of a new enzyme label producing a long-term chemiluminescent signal. *J Biolumin Chemilumin*. 1989; 4: 129-35.

Jaworska-Feil L, Budziszewska B, Lason W. Effects of repeated cocaine administration on the thyrotropin-releasing hormone level and receptors in the rat brain. *Neuropeptides* 1997; 31: 253-258.

Jeandel C, Nicolas MB, Dubois F, Nabet-Bellaville F, Penin F, Cuny G. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1989; 35: 275-282.

Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative diseases. *Lancet* 1994; 344: 796-798.

Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewi body disease. *Ann Neurol* 1992; 32: S82-S87.

Jernigan TL, Butters N, Di Triaglia G, Schafer K, Smith T, Irwin M, Grant L, Schuckit M, Cermak LS. Reduced cerebral grey matter observed in alcoholics using magnetic resonance imaging. *Alcohol Clin Exp Res* 1991a; 15: 418-427.

Jernigan TL, Schafer K, Butters N. Magnetic resonance imaging of alcoholic Korsakoff patients. *Neuropsychopharmacology* 1991b; 4: 175-186.

Jiang C, Agulian S, Haddad GG. Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> homeostasis during anoxia in rat hypoglossal neurons: intracellular and extracellular *in vitro* studies. *J Physiol* 1992; 448: 697-708.

Jiang C, Haddad GG. Differential responses of neocortical neurons to glucose and/or O<sub>2</sub> deprivation in the human and rat. *J Neurophysiol* 1992; 68: 2165-2173.

Johnson BA, Campling GM, Griffiths P, Cowen PJ. Attenuation of some alcohol-induced mood changes and the desire to drink by 5-HT<sub>3</sub> receptor blockade: A preliminary study in healthy male volunteers. *Psychopharmacology* 1993; 112: 142-144.

Johnston MV, McKinney M, Coyle JT. Neocortical cholinergic innervation: A description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 1981; 43: 159-172.

Jones DG. Synapses and synaptosomes. Londres, Chapman & Hall 1976.

Jones DG, Bradford HF. Observations on the morphology of mammalian synaptosomes following their incubation and electrical stimulation. *Brain Res* 1971; 28: 491-499.

Jones WL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome. *Lancet* 1973; 2: 999-1001.

Jornvall H, Hempel J, Vallee B. Structures of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Enzyme* 1987; 37: 5-18.

Kaku DA, Goldberg MP, Choi DW. Antagonism of non-NMDA receptors augments the neuroprotective effects of NMDA receptor blockade in cortical cultures subjected to prolonged deprivation of oxygen and glucose. *Brain Res* 1991; 554: 344-347.

Kalant H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addict Biol* 1996; 1: 133-141.

Kalant H. Drug tolerance and sensitization. En: *Psychoactive drugs*. Goudie AJ, Emmett-Oglesby M (eds). Clifton, The Humana Press 1989; 547-577.

Kalant H. Research on tolerance: what can we learn from history?. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 67-76.

Kalant H, LeBlanc AE, Gibbins RJ. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmac Rev* 1971; 23: 135-191.

Kalivas PW, Samson HH. The neurobiology of drug and alcohol addiction. *Ann NY Acad Sci* 1992; 654.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de neurociencia*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana 2001.

Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutsumi S. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of  $\beta$ -amyloid. En: *Frontiers of the mechanisms of memory and dementia*. Kato T (ed). Amsterdam, Elsevier Science 1995; 97-100.

Kang MH, Spigelman I, Sapp DW, Olsen RW. Persistent reduction of GABAA receptor-mediated inhibition in rat hippocampus after chronic intermittent ethanol treatment. *Brain Res* 1996; 709: 221-228.

Kania RK, Santiago NA, Grat GM. Intestinal surface amino-oligopeptidases. II. Substrate kinetics and topography of the active site. *J Biol Chem* 1977; 252: 4929-4934.

Kant GJ, Wright WL, Robinson TL, D'Angelo CP. Effect of MK-801 and learning and memory as assessed using a novel water maze. *Pharmac Biochem Behav* 1991; 39: 479-485.

Karcz-Kubicha M, Liljequist S. Effect of post-ethanol administration of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the development of ethanol tolerance in C57BI mice. *Psychopharmacology* 1995; 120: 49-56.

Karuzina II, Archakov AI. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. *Free Radical Biol Med* 1994; 16: 73-97.

Katayama Y, Kawamata T, Tamura T, Hovda DA, Becker DP, Tsubokawa T. Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia *in vivo*. *Brain Res* 1991; 558: 136-140.

Katchman AN, Hershkowitz N. Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol* 1993; 70: 1-7.

Kato K, Puttfarcken PS, Lyons W, Coyle JT. Developmental time course and ionic dependence of kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell-cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 402-411.

Katsuura G, Yoshikawa K, Itoh S, Hsiao S. Behavioral effects of thyrotropin-releasing hormone in frontal decorticated rats. *Peptides* 1984; 5: 899-903.

Katzman R. Normal aging and the brain. *NIPS* 1988; 3: 197-200.

Keen P, White TD. A light-scattering technique for the study of the permeability of rat brain synaptosomes *in vitro*. *J Neurochem* 1970; 17: 565-571.

Kelly JA, Neidle EL, Neidle A. An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. *J Neurochem* 1983; 40: 1727-1734.

Khachaturian ZS. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann NY Acad Sci* 1994; 747: 1-11.

Khanna JM, Kalant H, Shah G, Chau A. Effect of (+)MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull* 1992; 28: 311-314.

Khanna JM, Kalant H, Shah G, Chau A. Tolerance to ethanol and cross-tolerance to pentobarbital and barbital in four rat strains. *Pharmac Biochem Behav* 1991b; 39: 705-709.

Khanna JM, Lê AD, Kalant H, LeBlanc A. Cross-tolerance between ethanol and morphine with respect to their hypothermic effects. *Eur J Pharmacol* 1979; 59: 145-149.

- Khanna JM, Wu PH, Weiner J, Kalant H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull* 1991a; 26: 643-645.
- Kilpatrick GJ, Jones BJ, Tyers MB. Identification and distribution of 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 1987; 330: 1746-748.
- Kim JP, Choi DW. Quinolate neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 1987; 23: 423-432.
- Kim JJ, DeCola JP, Landeira-Fernandez J, Fanselow MS. N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav Neurosci* 1991; 195: 126-133.
- Kim JP, Koh J, Choi DW. L-Homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons. *Brain Res* 1987; 437:103-119.
- King MA, Hunter BE, Walker DW. Alterations and recovery of dendritic spine density in rat hippocampus following long-term ethanol ingestion. *Brain Res Bull* 1988; 459: 381-385.
- Kirschke H, Langner J, Weideranders B, Ansorge S, Bohley P, Hanson H. Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta Biol Med Germ* 1977; 36: 185-199.
- Kish SJ, Bergeron C, Rajput A, Dozic S, Mastrogiacomo F, Chang LJ, Wilson JM, Distefano LM, Nobrega JM. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1992; 59: 776-779.
- Kiyatkin EA. Functional significance of mesolimbic dopamine. *Neurosci Behav Rev* 1995; 19: 573-598.
- Klegeris A, Korkina LG, Greenfield SA. Autoxidation of dopamine: a comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 215-222.
- Knapp DJ, Pohorecky LA. Zacopride, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, reduces voluntary ethanol consumption in rats. *Pharmac Biochem Behav* 1992; 41: 847-850.
- Knight M, Klee WA. The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy. *J Biol Chem* 1978; 253: 3843-3847.
- Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23: 1367-1379.
- Koechling UM, Smith BR, Amit Z. Differential effects of catecholamine antagonists on ethanol-induced excitation in mice. *Psychopharmacology* 1990; 102: 234-238.

Kok AB. Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Med Hypoth* 1997; 48: 281-296.

Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Res Rev* 1984; 8: 65-98.

Kollegger H, McBean GJ, Tipton KF. Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmac* 1992; 45: 260-264.

Kombian SB, Zidichouski JA, Pittmanm QJ. GABAB receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus *in vitro*. *J Neurophysiol* 1996; 76: 1166-1179.

Koob GF. Drugs addiction: the Yin and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 1996; 16: 893-896.

Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmac Sci* 1992; 13: 177-184.

Koob GF, Bloom FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 1988; 242: 715-723.

Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 1997; 278: 52-58.

Koob GF, Rassnick S, Heinrichs S, Weiss F. Alcohol, the reward system and dependence. En: *Toward a molecular basis of alcohol use*. Jansson H, Jornvall N, Terenius L, Vallee BL (eds). Birkhauser Verlag, Basel 1994; 103-114.

Kopera-Frye K, Dehaene S, Streissguth H. Impairments of number processing induced by prenatal alcohol exposure. *Neuropsychology* 1996; 34: 1187-1196.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 834-842.

Kopun M, Propping P. The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1977; 11: 337-344.

Korsakoff SS. Eine mèdico-psychologique sur une forme des maladies de la memorie. *Rev Philos* 1889; 5: 501-530.

- Korsakoff SS. Eine psychische storung combinirt mit multipler neuritis (psychosis polyneuritica seu cerebropathia psychia toxaemica). *Allg Z Psychiat* 1890; 46: 475-485.
- Kostowski W, Dyr W, Krzascik P. The abilities of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ICS 205-930 to inhibit alcohol preference and withdrawal seizures in rats. *Alcohol* 1993; 10: 369-373.
- Kovács GL, Sarnyai Z, Szabó G. Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23: 945-962.
- Kozlov AV, Osipov AN, Vladimirov IA. A mechanism of luminol-dependent chemiluminescence of human serum in the presence of hydrogen peroxide. *Biofizika* 1990; 35: 347-9.
- Kricka LJ, Carter TJN. *Clinical and biochemical luminiscence*. New York, Marcel Dekker 1982.
- Krill JJ. Neuropathology of thiamine deficiency disorders. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 9-17.
- Krill JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 1997; 79: 983-998.
- Krill JJ, Harper CG. Neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains. *Acta Neuropathol* 1989; 41: 67-80.
- Krnjevic K, Ben-Ari Y. Anoxia changes in dentate granule cells. *Neurosci Lett* 1989; 107: 89-93.
- Krnjevic K, Leblond J. Anoxia reversibly suppresses neuronal calcium currents in rat hippocampal slices. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 2157-2161.
- Krnjevic K, Leblond J. Changes in membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia. *J Neurophysiol* 1989; 62: 15-30.
- Kubo H, Saitoh M, Murase S, Inomata T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Chemiluminescence of -lactam antibiotics based on the luminol reaction. *Anal Chim Acta* 1999; 389: 89-94.
- Küçükaya B, Haklar C, Yalçın AS. NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: Application of chemiluminescence assay. *Neurochem Res* 1996; 21: 1533-1536.
- Kugler P. On angiotensin-degrading aminopeptidases in the rat kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982; 76: 1-86.

Kulkosky PJ. Brain-gut neuropeptides and the limitation of ethanol consumption. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 179-190.

Lajtha A. *Handbook of neurochemistry*. New York, Plenum Press 1983.

Lal H, Harris CM, Benjamin D, Springfield AC, Bhadra S, Emmet-Oglesby MW. Characterization of a pentylentetrazol-like interoceptive stimulus produced by ethanol withdrawal. *J Pharmac Exp Ther* 1988; 247: 508-518.

Lancaster FE. Nitric oxide and ethanol-induced brain damage. A hypothesis. En: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (eds). Rockville, NHI 1993; 373-386.

Langalis PJ, Zhang SX. Extracellular glutamate is increased in thalamus during thiamine deficiency-induced lesions and is blocked by MK-801. *J Neurochem* 1993; 61: 2175-2182.

Langalis PJ, Zhang SX, Savage LM. Neurophatology of thiamine deficiency, an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 19-37.

Laposata EA, Lange LG. Presence of non-oxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986; 231: 497-499.

Lauffart B, McDermott JR, Biggins JA, Gibson AM, Mantle D. Purification and characterization of pyroglutamyl aminopeptidase from human cerebral cortex. *Biochem Soc Trans* 1989; 17: 207-208.

Lê AD, Khanna JM. Dispositional mechanisms in drug tolerance and sensitization. En: *Psychoactive drugs*. Goudie J, Emmet-Oglesby M (eds). Clifton, The Human Press 1989; 281-351.

Lees GJ. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 1993; 54: 287-322.

Lees GJ. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Rev* 1991; 16: 283-300.

Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, Hamberger A. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1990; 120: 159-162.

Lentzner A, Bykov V, Bartschat DK. Time-resolved changes in intracellular calcium following depolarization of rat brain synaptosomes. *J Physiol* 1992; 450: 613-628.

Leonard CM. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the medio dorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res* 1969; 12: 321-343.

Lerner WD, Fallon HJ. The alcohol withdrawal syndrome. *N Engl J Med* 1985; 313: 951-952.

Lescaudron I, Seguela P, Gaffard M, Verna A. Effects of long-term ethanol consumption on GABAergic neurons in the mouse hippocampus. a quantitative immunocytochemical study. *Drug Alcohol Depend* 1986; 18: 377-384.

Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 1983; 258: 11823-11827.

Levine RL, Garland D, Oliver CV, Amici A, Climent J, Lenz AG, Ahn BIU, Shaltiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186: 464-478.

Levine RL, Oliver CN, Fulks RM, Stadtman ER. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2120-2124.

Levy M, Koren G. Obstetric and neonatal effects of drugs of abuse. *Emerg Med N Am* 1990; 8: 633-652.

Lewis MJ. Alcohol reinforcement and neuropharmacologic therapeutics. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 17-25.

Lewis PD, Shute CCD. The cholinergic limbic system: Projection to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 1967; 90: 521-542.

Li TK. The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function. En: *Medical and social aspects of alcohol abuse*. Tabakoff B, Sutker PB, Randall CL (eds). New York, Plenum Pres, 1983; 47-77.

Li C, Peoples RW, Weight FF. Alcohol action on a neuronal membrane receptor: evidence for a direct interaction with the receptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8200-8204.

Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J M* 1988; 319: 1639-1650.

Lieber CS. Interference of ethanol in hepatic cellular metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1975; 252: 24.

Liljequist S. The competitive NMDA receptor antagonist, CGP-39551, inhibits ethanol withdrawal seizures. *Eur J Pharmac* 1991; 192: 197-198.

Liljequist S, Ekman A, Snape B, Söderrpalm B, Engel JA. Environment-dependent effects of ethanol on DOPAC and HVA in various brain regions of ethanol-tolerant rats. *Psychopharmacology* 1990; 102: 319-324.

Liljequist S, Ossowska K, Grabowska-Andén M, Andén NE. Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *Eur J Pharmac* 1991; 195: 55-61.

Lima-Landman MT, Albuquerque EX. Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett* 1989; 247: 61-67.

Lindboe C, Loberg E. The frequency of WKS in alcoholics, a comparison between the 5 year periods 1975-1979 and 1983-1987. *J Neurol Sci* 1989; 88: 107-113.

Linderstrom-Lang K. Uber darmerepsin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1929; 182: 151-174.

Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino-acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-622.

Litter M. *Farmacología experimental clínica*. Buenos Aires, El Ateneo 1988.

Little HJ. Mechanisms that may underlie the behavioral effect of ethanol. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 171-194.

Littleton J, Little HJ. Current concepts of ethanol dependence. *Addiction* 1994; 89: 1397-1412.

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Basbaum AI. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8383-8387.

Lobner D, Lipton P. Intracellular calcium levels and calcium fluxes in the CA1 region of the rat hippocampal slice during *in vitro* ischemia: relationship to electrophysiological cell damage. *J Neurosci* 1993; 13: 4861-4871.

Lock R, Johansson A, Orselius K, Dahlgren C. Analysis of horseradish peroxidase-amplified chemiluminescence produced by human neutrophils reveals a role for the superoxide anion in the light emitting reaction. *Anal Biochem* 1988; 173: 450-455.

Löscher W, Annis R, Honack D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. *Neurosci Lett* 1991; 128: 191-194.

Lovinger DM. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 267-282.

Lovinger DM. Developmental decrease in ethanol inhibition of N-methyl-Daspartate receptors in rat neocortical neurons: Relation in the actions of ifenprodil. *J Pharmac Exp Ther* 1995; 274: 164-172.

Lovinger DM. Ethanol potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in NCB-20 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 1991; 122: 57-60.

Lovinger DM. Exitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 19-27.

Lovinger DM, White G. Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 263-270.

Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 1989; 243: 1721-1724.

Lovinger DM, White G, Weight FF. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci* 1990; 10: 1372-1379.

Luhmann HJ, Heinemann U. Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *J Neurophysiol* 1992; 67: 798-811.

Lundqvist H, Dahlgren C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 785-792.

Lundqvist H, Kricka LJ, Stott RA, Thorpe GH, Dahlgren C. Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils. *J Biolumin Chemilumin* 1995; 10: 353-359.

Luttinger D, Frye GD, Nemeroff CB, Prange AJ Jr. The effects of neurotensin, beta-endorphin, and bombesin on ethanol-induced behaviors in mice. *Psychopharmacol Berl* 1983; 79: 257-263.

Lynch MJG. Brain lesions in chronic alcoholism. *Arch Pathol* 1960; 69: 342-353.

Mackler SA, Eberwine JH. The molecular biology of addictive drugs. *Mol Neurobiol* 1991; 5: 45-58.

Madeira MD, Andrade JP, Lieberman AR, Sousa N, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J Neurosci* 1997; 17: 1302-1319.

Mamelak M. Neurodegeneration, sleep, and cerebral energy metabolism. A testable hypothesis. *J Geriatr Psychiat Neurol* 1997; 10: 29-32.

Mann UM, Mohr E, Gearing M, Chase TM. Heterogeneity in Alzheimer's disease: progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 956-959.

Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Perry RH, Perry EK. Comparison of cathepsin protease activities in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewi body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Sci* 1995; 131: 65-70.

Marchbanks RM, Campbell WB. Sodium and chloride fluxes in synaptosomes *in vitro*. *J Neurochem* 1976; 26: 973-980.

Mantle D, Lauffart B, Perry EK, Perry RH. Comparison of major cortical aminopeptidase activity in normal brain and brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1989; 89: 227-234.

Mantle D, Perry EK. Comparison aminopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase and tripeptidyl aminopeptidase activities in brain tissue from normal and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1990; 98: 13-20.

Marcuse R, Johansson L. Studies on the TBA test for rancidity grading. II. TBA reactivity of different aldehyde classes. *J Am Oil Chem Soc* 1973; 50: 387-391.

Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP. Amyloid beta peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons. Involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 1997; 17: 1046-1054.

Markowitsch HJ. Diencephale amnesia, a reorientation towards tracts?. *Brain Res Rev* 1988; 13: 351-370.

Marks N, Datta RK, Lajtha A. Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J Biol Chem* 1968a; 243: 2882-2889.

Marks N, Datta RK, Lajtha A. The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. En: *Macromolecules and the function of the neurone*. Lodin Z (ed). Amsterdam, Excerpta Medica 1968b; 220-231.

Marks N, Grynbaum A, Neidle A. On the degradation of enkephalins and endorphins by rat and mouse brain extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 74: 1552-1559.

Martin PR, Adinoff B, Weingartner H, Mukherjee AB, Eckardt MJ. Alcoholic organic brain disease: Nosology and pathophysiologic mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1986; 10: 147-164.

Martin SJ, Cotter TG. Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1991; 59: 1001-1016.

Martin RL, Lloyd HGE, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?. *TINS* 1994; 17: 251-257.

Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Arrazola-Saniger M, Ramírez- Huertas JM. Neurotoxicidad inducida por aminoácidos excitatorios. *Rev Clin Esp* 1996; 196: 121-127.

Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Mayas-Torres, MD, García-López MJ, Ramírez-Sánchez M. Utility of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay to measure mitochondrial activity in K<sup>+</sup>- and ATP-stimulated rodent cortex synaptosomes. *Neurosci Res Commun* 2000; 27: 103-107.

Martini A, Battaini F, Govoni S, Volpe P. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor and ryanodine receptor in the aging brain of wistar rats. *Neurobiol Aging* 1994; 15: 203-206.

Martins AR, Caldo H, Coelho HLL, Moreira AC, Antunes-Rodrigues J, Greene LJ, Martins-Camargo AC. Screening for rabbit brain neuropeptide-metabolizing peptidases. Inhibition of endopeptidase B by bradykinin potentiating peptide 9<sub>a</sub> (SQ 20881). *J Neurochem* 1980; 34: 100-107.

Massarelli R. Effect of ethanol on the cholinergic system. En: *Biochemistry and pharmacology ethanol*. Majchrowicz E, Noble EP (eds). New York, Plenum Press 1979; 223-240.

Masur J, Boerngen R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. *Pharmac Biochem Behav* 1980; 13: 777-780.

Mathe J, Nomikos GG, Hildebrand BE, Hertel P, Svensson TH. Prazosin inhibits MK-801-induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmac* 1996; 309: 1-11.

Matsubara C, Ishii K, Takamura K. Flow injection analysis for determination of choline-containing phospholipids by luminol chemiluminescence. *Yakugaku-Zasshi* 1992; 112: 50-5.

Matsuda T, Shimizu I, Murata Y, Baba A. Glucose and oxygen deprivation induces a  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated decrease in  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  activity in rat brain slices. *Brain Res* 1992; 576: 263-270.

Matsumoto I, Davidson M, Wilce PA. Polyamine-enhanced NMDA receptor activity: effect of ethanol. *Eur J Pharmacol* 1993a; 247: 289-294.

Matsumoto I, Leah J, Shanley B, Wilce PA. Immediate early gene expression during ethanol withdrawal. *Mol Cell Neurosci* 1993b; 4: 485-491.

Mayas MD, Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M. Influencia del alcohol etílico sobre la actividad aminopeptidasa A de sinaptosomas corticales de ratón. *Arch Neurociencia* 2000a; 5: 120-126.

Mayas MD, Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Tsuboyama GK, Prieto I, Arechaga G, Ramírez m. Estudio in vitro del efecto del etanol sobre la actividad piroglutamato aminopeptidasa en sinaptosomas de ratón en condiciones basales y despolarizantes. *Rev Neurol* 2000b; 30: 128-131.

Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 1987; 28: 197-276.

Mayes AR, Meudell PR, Mann D, Pickering A. Locations of the lesions in Korsakoff's syndrome. Neuropathological data on two patients. *Cortex* 1988; 24: 367-388.

McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994; 74: 723-760.

McBride WJ, Murphy JM, Gatto GJ, Levy AD, Lumeng L, Li TK. Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake. *Alcohol Alcohol* 1997; 1: 411-416.

McBrien DCH, Slater TF. Free radicals, lipid peroxidation and cancer. Londres, Academic Press 1982

McCapra F. Chemical mechanisms in bioluminescence *Acc Chem Res* 1976; 9: 201-208.

McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-357.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.

McCown TJ, Fry GD, Breese GR. Evidence for site specific ethanol actions in the CNS. *Alcohol Drug Res* 1985; 6: 423-429.

- McDermott JR, Mantle D, Lauffart B, Gibson AM, Biggins JA. Purification and characterization of two soluble Cl<sup>-</sup> activated arginyl aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptides. *J Neurochem* 1988; 50: 176-182.
- McDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Baker JL. NMDA receptors activation increased cytoplasmatic Ca<sup>2+</sup> concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 1986; 321: 519-522.
- McDonald JK, Barrett AJ. *Mammalian Proteases. A glossary and Bibliography*. Orlando, Academic Press 1986.
- McDonald RL. Ethanol,  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptors, and protein kinase C phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 3633-3635.
- McDonald RL, Olsen RW. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17: 569-602.
- McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory and the aging brain. *Psychopharmacology* 1993; 111: 391-401.
- McEntee WJ, Mair RG. The Korsakoff syndrome, a neurochemical perspective. *Trends Neurosci* 1990; 13: 340-344.
- McGeer PL, McGeer EG. Amino acid neurotransmitters. En: *Basic neurochemistry*. Siegel GJ, Albers RW, Agranoff BW, Datzman R (eds). New York, Raven Press 1989; 311-332.
- McMahon A, Lephart ED, Chi S, Lee M, Iacopino AM, German DC. Calbindin D 28K, in the nucleus of nerve growth factor-treated PC12 cells. *Neuroreport* 1996; 7: 2419-2422.
- McMahon HT, Nicholls DG. The bioenergetics of neurotransmitters release. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1059: 243-264.
- McMullen PA, Saint-Cyr JA, Carlen PL. Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Comp Neurol* 1984; 225: 111-118.
- Mechoulam R. *Cannabinoids as therapeutic agents*. Boca Raton, CRC Press 1986.
- Mehta AK, Ticku MK. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub>-gated chloride channels. *J Pharmac Exp Ther* 1988; 246: 558-564.
- Meissner WW. Learning and memory in the Korsakoff's syndrome. *Int J Neuropsychiat* 1968; 4: 6-20.

Melchior CL, Tabakoff B. Features of environment-dependent tolerance to ethanol. *J Psychopharmacology* 1985; 87: 94-100.

Melchior CL, Tabakoff B. Modification of environmentally cued tolerance to ethanol in mice. *J Pharmac Exp Ther* 1981; 219: 175-180.

Melgaard B, Henriksen L, Ahlgren P, Danielsen UT, Sorensen H, Paulson OB. Regional cerebral blood flow in chronic alcoholics measured by single photon emission computerized tomography. *Acta Neurol Scand* 1990; 82: 87-93.

Melis F, Stancampiano R, Imperato A, Carta G, Fadda F. Chronic ethanol consumption in rats, correlation between memory performance and hippocampal acetylcholine release *in vivo*. *Neuroscience* 1996; 74: 155-159.

Merenyi G, Lind J, Eriksen TE. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *J Biolumin Chemilumin* 1990; 5: 53-6.

Mereu G, Fadda F, Gessa GL. Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unaesthetized rats. *Brain Res* 1984; 292: 63-69.

Mereu G, Gessa GL. Low doses of ethanol inhibit the firing of neurons in the substantia nigra, pars reticulata: a GABAergic effect?. *Brain Res* 1985; 360: 325-330.

Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. Central cholinergic pathways in the rat. An overview based on an alternate nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 1983; 10: 1185-1201.

Meyers FH, Jawetz E, Goldfien A. *Manual de farmacología clínica*. México, El Manuel Moderno SA 1981.

Mhatre M, Ticku MK. Chronic ethanol treatment upregulates the GABA receptor-b subunit expression. *Mol Brain Res* 1994; 23: 246-252.

Mihic SJ, Wu PH, Kalant H. Potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated chloride flux by pentobarbital and diazepam but not ethanol. *J Neurochem* 1992; 58: 745-751.

Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA<sub>A</sub> and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-389.

Miller MW. The effects of prenatal exposure to ethanol on cell proliferation and neuronal migration. En: *Development of the central nervous system: Effects of alcohol and opiates*. Millar MW (ed). New York, Wiley-Liss 1992; 47-69.

Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P. The metabolic stability of the enkephalins. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 74: 1311-1317.

Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A physiological role for GABA<sub>B</sub> receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 423-462.

Miyamoto M, Coyle JT. Idebenone attenuates neuronal degeneration induced by intrastriatal injection of excitotoxins. *Exp Neurol* 1990; 108: 38-46.

Miyashita K, Abe H, Nakajima T, Ishikawa A, Nishima-suzuki M, Naritomi H, Tanaka R, Sawada T. Glutamate release in the gerbil hippocampus after middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport* 1994; 5: 945-948.

Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1450-1455.

Mizuno Y, Suzuki K, Ohta S. Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1990; 96: 49-57.

Moghaddam B, Bolinao M. Biphasic effects of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 1994; 178: 99-102.

Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg GE. NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. *Exp Brain Res* 1989; 75: 449-456.

Montoliu C, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem* 1994; 63: 1855-1862.

Montpied P, Morrow AL, Karanian JW, Ginns EI, Martin BM, Paul SM. Prolonged ethanol inhalation decreases gamma-aminobutyric acid receptor subunit mRNAs in the rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 157-163.

Monyer H, Hartley DM, Choi DW. 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron* 1990; 5: 121-126.

Morari M, O'Connor WT, Ungerstedt U, Bianchi C, Fuxe K. Functional neuroanatomy of the nigrostriatal and striatonigral pathways as studied with dual probe microdialysis in the awake rat. 2. Evidence for striatal N-methyl-D-aspartate receptor regulation of striatonigral gabaergic transmission and motor function. *Neuroscience* 1996; 72: 89-97.

Moreno JJ, Pryor WA. Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 425-431.

---

Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. *Science* 1988; 237: 192-197.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate early genes. *Trends Neurosci* 1989; 12: 459-462.

Morgan PF, Nadi NS, Karanian J, Linnoila M. Mapping rat brain structures activated during ethanol withdrawal: role of glutamate and NMDA receptors. *Eur J Pharmac* 1991; 225: 217-223.

Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1219-1237.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade and longterm potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; 319: 774-776.

Morrisett RA, Rezvani AH, Overstreet D, Janowsky DS, Wilson WA, Swartzewelder HS. MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats. *Eur J Pharmac* 1990; 176: 103-105.

Morrisett RA, Swartzewelder HS. Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J Neurosci* 1993; 13: 2264-2272.

Morrow AL. Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor function and gene expression in the central nervous system. En: *International review of neurobiology*. Bradley RJ, Harris RA (eds). New York, Academic Press 1995; 1-41.

Morrow AL, Herbert JS, Montpied P. Differential effects of chronic ethanol administration on GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$  and  $\alpha 6$  subunit mRNA levels in rat cerebellum. *J Mol Cell Neurosci* 1992; 3: 251-258.

Morrow AL, Montpied P, Lingford-Hughes A, Paul SM. Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: effect on GABA<sub>A</sub> receptor function and expression in brain. *Alcohol* 1990; 7: 237-244.

Morse RM, Flavin D. The definition of alcoholism. *J Am Med Assoc* 1992; 268: 1012-1014.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular pgrowth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.

Mucha RF, Pinel JPL. Increased susceptibility to kindled seizures in rats following a single injection of alcohol. *J Stud Alcohol* 1979; 40: 258-271.

- Mudge AW, Fellows RE. Bovine pituitary pyrrolidonecarboxyl peptidase. *Endocrinology* 1973; 93: 1428-1234.
- Muller-Peddinghans R. In vitro determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminiscence. *Int J Immunopharmacol* 1984; 6: 455-466.
- Mullins LJ. Some physical mechanisms in narcosis. *Chem Rev* 1954; 54: 289-323.
- Multhaup G. Amyloid precursor protein, copper and Alzheimers disease. *Biomed Pharmacother* 1997; 51: 105-111.
- Mungall BA, Shinkel TA, Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience* 1995; 67: 505-524.
- Murase S, Mathè JM, Grenhoff J, Svenson TH. Effect of dizolcipine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: differential actions on firing pattern related to anatomical localization. *J Neurol Transm* 1993; 91: 13-25.
- Murphy BL, Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS, Roth RH. Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1325-1329.
- Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S, Nakagana Y, Takemoto T. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Anal Biochem* 1976; 74: 466-476.
- Nasrallah HA, Andreasen NC, Coffman JA, Olson SC, Dunn VD, Ehrhardt JC, Chapman SM. A controlled magnetic resonance imaging study of corpus callosum thickness in schizophrenia. *Biol Psychiatric* 1986; 21: 274-282.
- Nedergaard M, Goldman SA, Desai S, Pulsinelli WA. Acid-induced death in neurons and glia. *J Neurosci* 1991; 11: 2489-2497.
- Neff NH, Hadjiocostantinou M, Wemlinger TA, Rossetti ZL. Tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activities during ethanol withdrawal. *Soc Neurosci Abstr* 1995; 21: 1134.
- Nei K, Matsuyama S, Shuntoh H, Tanaka C. NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 1996; 728: 105-110.
- Nelson BK, Brightwell WS, MacKenzie-Taylor DR, Burg JR, Massari VJ. Neurochemical, but not behavioural, deviations in the offspring of rats following prenatal or paternal inhalation exposure to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 1988; 10: 15-22.

Nestoros JN. Ethanol specifically potentiates GABA-mediated neurotransmission in feline cerebral cortex. *Science* 1980; 209: 708-710.

Netzeband JG, Trotter C, Parsons KL, Gruol DL. Chronic ethanol treatment alters AMPA-induced calcium signals in developing Purkinje neurons. *Brain Res* 1999; 826: 270-80.

Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 1995; 26: 305-336.

Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmac Sci* 1990; 11: 462-469.

Niki E. Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview. En: *Free radicals: from basic science to medicine*. Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds). Suiza, Birkhäuser Verlag Basel 1993; 365-373.

Nishio M, Narahashi T. Ethanol enhancement of GABA-activated chloride current in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1990; 518: 283-286.

Nordberg A, Larsson C, Perdahl E, Winblad B. Changes in cholinergic activity in human hippocampus following chronic alcohol abuse. *Pharmac Biochem Behav* 1983; 18: 397-400.

Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissue. *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 231-237.

Nordmann R, Rouach H. Free radical mechanisms and ethanol-induced brain injury. En: *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Deitrich RA, Erwin VG (eds). USA, Boca Raton CRC Press 1996; 329-342.

Nutt DJ, Glue P. Neuropharmacological and clinical aspects of alcohol withdrawal. *Ann Med* 1990; 22: 275-281.

O'Connor MJ, Brill NJ, Sigman M. Alcohol use in primiparous women older than 30 years of age: Relation to infant development. *Pediatrics* 1986; 78: 444-450.

O'Connor B, O'cuinn G. Localization of a narrow-specificity thyroliberin-hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 1984; 144: 271-278.

Okubo Y, Suhara T, Suzuki K. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 1997; 385: 634-636.

Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 1993; 16: 439-444.

- Olanow CW. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1992; 32: 2-9.
- Oliver CN. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 62-72.
- Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987a; 262: 5488-5491.
- Oliver CN, Levine RL, Stadtman ER. A role of mixed-function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J Am Geriatr Soc* 1987b; 35: 947-956.
- Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Lin GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5144-5147.
- Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164: 719-721.
- Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. En: Kainic acid as a tool in neurobiology. McGee EG, Olney JW, McGee PL (eds). New York, Raven Press 1978; 311-332.
- Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol* 1986; 44: 857-877.
- Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic, sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 1971; 14: 61-76.
- Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci* 1979; 2: 313-366.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of  $Ca^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmac Sci* 1989; 10: 281-285.
- Orrenius S. Mechanisms of oxidative cell damage. En: Free radicals: from basic science to medicine. Poli G, Albano E, Dianzani MU, (eds). Suiza, Birkhäuser Verlag Basel 1993; 47-64.
- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GEN, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32: S33-S34.

Ortiz J, Fitzgerald LW, Charlton M, Lane S, Trevisan L, Guitart X, Shoemaker W, Duman RS, Nestler EJ. Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system. *Synapse* 1995; 21: 289-298.

Osmanovic SS, Shefner SA. Enhancement of current induced by superfusion of GABA in locus coeruleus neurons by pentobarbital, but not ethanol. *Brain Res* 1990; 517: 324-329.

Packer L, Kagan VE. Vitamin E: the antioxidant having center of membranes and lipoproteins. En: *Vitamin E in health and disease*. Packer L, Fuchs J (eds). New York, Marcel Dekker 1993; 179-192.

Palmer AM, Gershon S. Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic. *FASEB J* 1990; 4: 2745-52.

Parada-Turska J, Tursky WA. Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory. *Neuropharmacology* 1990; 29: 1111-1116.

Parker ES, Morihisa JM, Wyatt RJ, Schwartz BL, Weingartner H, Stillman RC. The alcohol facilitation effect on memory. A dose-response study. *Psychopharmacology* 1981; 74: 88-92.

Parker WD, Boyson SJ, Luder AS, Parks JK. Evidence for a defect in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Huntington's disease. *Neurology* 1990a; 40: 1231-1234.

Parker WD, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990b; 40: 1302-1303.

Peinado JM, Martínez-Martos JM, Afailal M, Iribar C. Canales de calcio y mecanismos de liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central. *Folia Neuropsiquiat* 1996; 31: 123-139.

Peinado JM, McMannus KT, Myers RD. Rapid method for microanalysis of endogenous amino acid neurotransmitters in brain perfusates in the rat by isocratic HPLC-EC. *J Neurosci Methods* 1986; 18: 269-276.

Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 1990; 10: 1035-1041.

Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J Neurochem* 1988; 51: 1960-1963.

Pellicano M, Siciliano F, Sadile AG. NMDA receptors modulate long term habituation to spatial novelty: dose- and geno-type-dependent differential effects of opostrial MK-801 and CCP in rats. *Physiol Behav* 1993; 54: 563-568.

Peoples RW, Weight FF. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2825-2829.

Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptors. *J Neurochem* 1993; 60: 408-416.

Pfeffer AO, Samson HH. Haloperidol and apomorphine effects on ethanol reinforcement in free feeding rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 29: 343-350.

Pfefferbaum A, Lim KO, Desmond JE, Sullivan EV. Thinning of the corpus callosum in older alcoholic men. A magnetic resonance imaging study. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 752-757.

Pfefferbaum A, Lim KO, Zipursky RB, Mathalon DH, Rosenbloom MJ, Lane B, Ha CN, Sullivan EV. Brain gray and white matter volume loss accelerates with aging in chronic alcoholics. A quantitative MRI study. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 1078-1089.

Pfefferbaum A, Rosenbloom M. In vivo imaging os morphological brain alterations associated with alcoholism. En: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (eds). Rockville: US Department of Health and Human Service 1993; 71-87.

Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Shear PK, Rosenbloom MJ, Lim KO. Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1177-1191.

Pfleiderer G, Celliers PG. Isolierung einer aminopeptidase aus nierenpartikeln. *Biochem Z* 1963; 339: 186-189.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 1987; 49: 413-435.

Phillips SC, Cragg BG. Chronic consumption of alcohol by adult mice. Effects on hippocampal cells and synapses. *Exp Neurol* 1983; 80: 218-226.

Phillips SC, Harper CG, Kril JA. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain* 1987; 110: 301-314.

Phillips SC, Harper CG, Kril JA. The contribution on Wernicke's encephalopathy to alcohol-related cerebellar damage. *Aust Drug Alcohol Rev* 1990; 9: 53-60.

Phillips TJ, Huson M, Gwiazdon C, Burkhart-Kasch S, Shen EH. Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 269-278.

Piergiacomi G, Giulietti AA, Muti S, Silveri F, Cervini C. Stimulated chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis: in vivo enhancement by auranofin. *Z Rheumatol* 1988; 47: 151-155.

Pliska V, Thorn NA, Vilhardt H. In vitro uptake and breakdown of tritiated lysine-vasopresine by bovine neurohypophyseal and cortical tissue. *Acta Endocrinol* 1971; 67: 12-22.

Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DK, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14: 151-168.

Pohorecky LA. The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci Biobehav Rev* 1981; 5: 209-229.

Pohorecky LA, Roberts P. Daily dose of ethanol and the development and decay of acute and chronic tolerance and physical dependence in rats. *Pharmac Biochem Behav* 1992; 42: 831-842.

Pohorecky LA, Roberts P. Development of tolerance to and physical-dependence on ethanol-daily versus repeated cycles treatment with ethanol. *alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 824-833.

Poli G, Cheeseman MU, Dianzani MU, Slater TF. Free radicals in liver injury. Oxford, IRL Press 1985.

Popov PI, Roslyi IM, Malov VA, Pak SG. The chemiluminescence of the polymorphonuclear leukocytes in food poisoning. *Ter Arkh* 1990; 62: 28-30.

Poulos CX, Cappell H. Homeostatic theory of drug tolerance: a general model of physiological adaptation. *Psychol Rev* 1991; 98: 390-408.

Prasad C, Balasubramanian P. Cyclo(His-Pro) and the development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol. *Neuropeptides* 1988; 12: 75-79.

Pratt J. The biological bases of drug tolerance and dependence. Londres, Academic Press 1991.

Press EM, Porter RR, Cebra J. The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen. *Biochem J* 1960; 74: 501-514.

Press GA, Amaral DG, Squire LR. Hippocampal abnormalities in amnesic patients revealed by high-resolution magnetic resonance imaging. *Nature* 1989; 341: 54-57.

Przewlocka B, Lason W. The effect of single and repeated ethanol administration of hypothalamic opioid systems activity -- an in vitro release study. *Drug Alcohol Depend* 1991; 27: 63-67.

Przewlocka B, Lason W. Stress prevents the chronic ethanol-induced delta opioid receptor supersensitivity in the rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm* 1990; 42: 137-142.

Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJC, Chand JE, Seeley PJ, Sundstrom LE. Neuroprotection by both NMDA and non NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. *Brain Res* 1997; 755: 36-46.

Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers B, Ymer S, Kettenmann H, Shofield PR, Seeberg PH. Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989; 338: 582-585.

Prusak E, Siewinski M, Szewczuk A. A new Fluorimetric method for the determination of gamma-glutamyltransferase activity in blood serum. *Clin Chim Acta* 1980; 107: 21-26.

Puttfarcken PS, Lyons WE, Coyle JT. Dissociation of nitric oxide generation and kainate-mediated neuronal degeneration in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1992; 31: 565-575.

Qin W, Zhang Z, Zhang C. Chemiluminescence flow system for vanadium(v) with immobilized reagents. *Analyst* 1997; 122: 685-8.

Raatikainen O, Kauppinen RA, Komulainen H, Taipale H, Pirttila T, Tuomisto J. Polyene antibiotics increase the ionic permeability of synaptosomal plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1345-1350.

Rabe CS, Tabakoff B. Glycine site-directed agonist reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 753-757.

Radi RA, Rubbo H, Prodanov E. Comparison of the effects of superoxide dismutase and cytochrome C on luminol chemiluminescence produced by xanthine oxidase-catalyzed reactions. *Biochim Biophys Acta* 1989; 994: 89-93.

Radi RA, Rubbo H, Thomson L, Prodanov E. Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8: 121-6.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM. Bases moleculares de los procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol* 1998; 26: 91-100.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Tsuboyama G, Prieto I, Aréchaga G, Ramírez M. Aminoglycoside antibiotics neomycin and kanamycin inhibit the increase of pyroglutamyl aminopeptidase activity by depolarizing synaptosomes of frontal cortex of the rat. *Rev Neurol* 2000a; 30: 1022-1026.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Prieto I, Alba F, Ramírez M. Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Horm Metab Res* 2000b; 32: 161-163.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM, Prieto I, García MJ, Ramírez M. Influencia del ácido oleico sobre la actividad angiotensinasa de astrogliá cortical de rata. *Arch Neurocién (Mex)* 1999; 4: 170-174.

Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Glutamate neurotoxicity does not modify aminopeptidase activities in mouse brain homogenates. *Neurosci Res Commun* 2002; 30: 103-110.

Rawat AK. Brain levels and turnover rates of presumptive neurotransmitters as influence by administration and withdrawal of ethanol in mice. *J Neurochem* 1974; 22: 915-922.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290: 205-218.

Reaux A, de Mota N, Zini S, Cadel S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology* 1999a; 69: 370-376.

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Sni S, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999b; 96: 13415-13420.

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: A central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 157-162.

Redei E, Branch B, Gholami S, Lin E, Taylor AN. Effect of ethanol on CRF release *in vitro*. *Endocrinology* 1988; 123: 2736-2743.

Reeck GR, De Haën C, Teller DC, Daolittle RF, Fitch WM, Dickerson RE, Chambous P, McLachlan AD, Margoliash E, Jukes TH, Zucherand E. Homology in proteins and nucleic acids: a terminology nuddle and a way out of it. *Cell* 1987; 50: 667.

Reed DJ. Interaction of vitamin E, ascorbic acid, and glutathione in projection against oxidative damage. En: *Vitamin E in health and disease*. Packer L, Fuchs J (eds). New York, Marcel Dekker 1993; 269-281.

- Reid LD, Hunter GA. Morphine and naloxone modulate intake of ethanol. *Alcohol* 1984; 1: 33-37.
- Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ. Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy. *J Neurosci Res* 1990; 27: 576-586.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533.
- Reiter RJ, García JJ, Pie J. Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. *Rest Neurol Neurosci* 1998; 12: 135-142.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggler B, Barlow-Walden LR, Chuang JI, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
- Reiter RJ, Poeggler B, Chen LD, Manchester LC, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15: 103-116.
- Renaud LP, Bourque CW. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 131-169.
- Reynolds JN, Prasad A. Ethanol enhances GABA<sub>A</sub> receptor-activated chloride currents in chick cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1991; 564: 138-142.
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467.
- Rinaldi R, Steindler EM, Wilford BB, Goodwin D. Clarification and standardization of substance abuse terminology. *J Am Med Assoc* 1988; 259: 555-557.
- Ripley TL, Little HJ. Effects on ethanol withdrawal hyperexcitability of chronic treatment with a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Pharmac Exp Ther* 1995; 272: 112-118.
- Rivett AJ. Regulation of intracellular protein turnover: covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation. *Curr Top Cell Regul* 1986; 28: 291-337.
- Rivett AJ, Levine RL. Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Arch Biochem Biophys* 1990; 278: 26-34.
- Rivier C, Bruhn T, Vale W. Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor. *J Pharmac Exp Ther* 1984; 229: 127-131.

Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shim ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* 1987; 139: 2593-2597.

Roberts EL Jr, Chih CP. Age-related alterations in energy metabolism contribute to the increased vulnerability of the aging brain to anoxic damage. *Brain Res* 1995; 678: 83-90.

Rodríguez GR, De Robertis E. Properties of isolated nerve-ending, En: *Current topics in membranes and transport*. Bronner F, Kleinzeller A (eds). New York, academic Press 1972; 237-272.

Rogers CJ, Hunter BE. Chronic ethanol treatment reduces inhibition in CAI of the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1992; 28: 587-592.

Rogers HJ, Spector RG, Trounce JR. *A textbook of clinical pharmacology*. Kent, Hodder & Stoughton 1981.

Rogovine VV, Mushtakova VM. The increasing effect of some synthetic peptides on luminol-dependent chemiluminescence of mouse blood. *Cell Biochem Funct* 1995; 13: 15-8.

Ron MA. *The alcoholic brain, CT scan and psychological findings*. Psychological medicine monograph supplement 3. Cambridge, University Press 1983.

Rongen HA, Hoetelmans RM, Bult A, Van Bennekom WP. Chemiluminescence and immunoassays. *J Pharm Biomed Anal* 1994; 12: 433-462.

Rose JE, Woolsey CN. The orbito-frontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Publ Ass Res Nerv Ment Dis* 1948; 27: 210-232.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Henatati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.

Rossett HL. A clinical perspective of the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4: 119-122.

Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1995; 283: 177-183.

Rossetti ZL, Carboni S, Melis F, Vaccari A, Gessa GL. NMDA receptor activation mediated glutamate and aspartate release from rat striatum: prevention by MK-801. *Neurochem Int* 1990; 16: 63-63.

Rossetti ZL, Hmaidan Y, Diana M, Gessa GL. Lack of tolerance to ethanol-induced stimulation of dopamine release in rats *Eur J Pharmac* 1993; 231: 203-207.

Rossetti ZL, Hmaidan Y, Gessa GL. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmac* 1992a; 221: 227-234.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Diana M, Gessa GL. Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. *Alcohol Clin Exp Res* 1992b; 16: 529-532.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL. Dramatic depletion of mesolimbic extracellular dopamine after withdrawal from morphine, alcohol or cocaine: a common neurochemical substrate for drug dependence. *Ann NY Acad Sci* 1992c; 654: 513-516.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL. Marked decrease of extraneuronal dopamine after alcohol withdrawal in rats: reversal by MK-801. *Eur J Pharmac* 1991a; 200: 371-372.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL. Suppression of dopamine release in alcohol abstinence syndrome: reversal by ethanol, MK-801 and gamma-hydroxybutyrate. En: *Biological Psychiatry*. Racagni G (ed). Amsterdam, Elsevier Science 1991b; 3-6.

Rothberg BS, Yasuda RP, Satkus SA, Wolfe BB, Hunter BE. Effect of chronic ethanol on cholinergic actions in rat hippocampus: electrophysiological studies and quantification of m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Brain Res* 1993; 631: 227-234.

Ryabinin AE, Criado JA, Henriksen SJ, Bloom FE, Wilson MC. Differential sensitivity of *c-fos* expression in hippocampus and other brain regions to moderate and low doses of alcohol. *Mol Psychiat* 1997; 2: 32-43.

Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 1992; 13: 329-380.

Sachs H, Russell JAG, Christmas DR, Cook B. Alteration of regional cerebral glucose metabolic rate in non-korsakoff chronic alcoholism. *Arch Neurol* 1987; 44: 1242-1251.

Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; 24: 1328-1331.

Saido TC. Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of  $\beta$ -amyloid. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 69-75.

Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997; 28: 1283-1288.

Samson HH. Initiation of ethanol-maintained behavior: A comparison of animal models and their implication for human drinking. En: *Advances in behavioral pharmacology*. Thompson T, Dews PB, Barrett JE (eds). Hillsdale, Lawrence Erlbaum 1987; 221-248.

Samson HH, Harris RA. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmac Sci* 1992; 13: 206-211.

Samson HH, Hodge CW. Neurobehavioral regulation of ethanol intake. En: *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Deitrich RA, Erwin VG (eds). USA, Boca Raton CRC Press 1996; 203-226.

Samson Y, Baron JC, Feline A, Bories J, Crouzel C. Local cerebral glucose utilization in chronic alcoholics, a positron tomographic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1986; 49: 1165-1170.

Sánchez-Amate MC, Carrasco MP, Zurera JM, Segovia JL, Marco C. Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzyme activities of chick-liver membranes. *Eur J Pharmacol* 1995; 292: 215-221.

Sánchez-Amate MC, Marco C, Segovia JL. Comparative study of the effect of ethanol on the fluidity of subcellular hepatic membranes. *Biochem Int* 1992; 27: 535-543.

Sanley BC, Wilce PA. Receptor changes associated with ethanol-induced brain damage. En: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (ed). Rockville: U.S Department of health and human services. 1993; 299-324.

Sanna E, Serra M, Cossu A, Colombo G, Follesa P, Cuccheddu T, Concas A, Biggio G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA<sub>A</sub> and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 115-123.

Saper CB. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. En: *The nervous system, handbook of physiology*. Mountcastle VB, Plum F, Geiger SR (eds). Baltimore, Williams & Wilkins 1987; 169-210.

Sasaki Y, Takimoto M, Oda K, Fruh T, Takai M, Okada T, Hori S. Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 1997; 68: 2194-2200.

Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. Determination of the time course and extent of neurotoxicity at defined temperatures in cultured neurons using a modified multiwell plate fluorescence scanner. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 455-463.

Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. D<sub>1</sub> dopamine receptors in prefrontal cortex. Involvement in working memory. *Science* 1991; 251: 947-950.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-827.
- Schauenstein E, Esterbauer H, Zollner H. Aldehydes in biological systems: their natural occurrence and biological activities. Londres, Pion Press 1977.
- Schellenberg GD, Anderson I, Swanson PD. The inhibition of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in rat brain by amiloride. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 251-258.
- Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21: 1086-1089.
- Schmidt CJ, Fadaye GM. Regional effects of MK-801 on dopamine release effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *J Pharmac Exp Ther* 1996; 277: 541-549.
- Schnebli HP. Adjuvant-induced inflammatory disease in the rat: plasma levels of peptide hydrolases and protease inhibitors reflect disease activity. *Agents Actions* 1979; 9: 497-501.
- Schnebli HP, Phillipps MA, Barclay RK. Isolation and characterization of enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1979; 569: 69-98.
- Schroeder HR, Yeager FM. Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems. *Anal Chem* 1978; 50: 1114-1120.
- Schulteis G, Koob GF. Reinforcement process in opiate addiction: a homeostatic model. *Neurochem Res* 1996; 21: 1437-1454.
- Schulteis G, Markou A, Cole M, Koob GF. Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5880-5884.
- Schuman ER, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17: 153-183.
- Schwabe C, McDonald JK. Demonstration of a pyroglutamyl residue at the N-terminus of the B-chain of porcine relaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 7: 1501-1504.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 1983; 219: 316-318.
- Schwartz JC, Giros B, Gros C, Llorens C, Malfroy B. Metabolism of enkephalins and its inhibition. En: *Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology*. Paton W, Mitchell S, Turner P (eds). Londres, McMillan Press 1984; 277-282.

Scorziello A, Meucci O, Calvani M, Schettini G. Acetyl-L-carnitine arginine amide prevents beta 25 35-induced neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Neurochem Res* 1997; 22: 257-265.

Seeley RJ, Hawkins MH, Ramsay DS, Wilkinson CW, Woods SC. Learned tolerance to the corticosterone-increasing action of ethanol in rats. *Pharmac Biochem Behav* 1996; 55: 269-273.

Seixas FA, Eggleston S. Alcoholism and the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1973; 215: 1-389.

Seixas FA, Eggleston S. Work in progress on alcoholism. *Ann NY Acad Sci* 1976; 273: 1-664.

Sellers EM, Toneato R, Romach MK, Somer GR, Sobell LC, Sobell MB. Clinical efficacy of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron in alcohol abuse and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 879-885.

Sewerynek E, Poeggler R, Melchior D, Reiter RJ. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neurosci Lett* 1995; 195: 203-205.

Shah J, Pant HC. Spontaneous calcium release induced by ethanol in the isolated rat brain microsomes. *Brain Res* 1988; 474: 94-99.

Shapiro ML, Caramonos Z. NMDA antagonist MK-801 impairs acquisition but not performance of spatial working and reference memory. *Psychobiology* 1990; 18: 231-243.

Shaw PJ. Excitatory amino acid neurotransmission, excitotoxicity and excitotoxins. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992; 5: 383-390.

Shaw PJ, Ince PG. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1997; 244: S3-S14.

Shaw SG, Cook WF. The histochemical localization of aminopeptidases in the central nervous system and an analysis of factors contributing to the final staining pattern. *Histochemistry* 1979; 63: 145-154.

Shear PK, Jernigan TL, Butters N. Volumetric magnetic resonance imaging quantification of longitudinal brain changes in abstinent alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 172-176.

Shen RY, Chiodo LA. Acute withdrawal after repeated ethanol treatment reduces the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 1993; 622: 289-293.

- Shepherd GM. Neurobiology. New York, Oxford University Press 1994.
- Shimamura M, Hazato T, Iwaguchi T. A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction: hydrolysis of enkephalin. *Brain Res* 1988; 445: 350-353.
- Shimamura M, Hazato T, Katayama T. A membrane-bound aminopeptidase isolated from monkey brain and its action on enkephalin. *Biochim Biophys Acta* 1983; 756: 223-229.
- Shoffner JM, Watts RL, Juncos JL, Torroni JL, Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 332-339.
- Shuckit MA. Ethanol induced changes in body sway in men at high alcoholism risk. *Arch Gen Psychiat* 1985; 42: 375-379.
- Shuckit MA. Subjective responses to alcohol in sons of alcoholics and control subjects. *Arch Gen Psychiat* 1984; 41: 879-884.
- Sieber FE, Traystman RJ, Martin LJ. Delayed neuronal death after global incomplete ischemia in dogs is accompanied by changes in phospholipase C, protein expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 527-533.
- Siegel S. Morphine analgesic tolerance: its situation specificity supports a Pavlovian conditioning model. *Science* 1976; 193: 323-325.
- Siegel S, Brose N, Janssen WG, Gasic GP, Jahn R, Heineman SF. Regional, cellular and ultrastructural distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunit in monkey hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 564-568.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative stress*. Sies H (ed). Londres, Academic Press 1985; 1-8.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-219.
- Siesjo BK. Historical overview: calcium, ischemia and death of brain cells. *Ann NY Acad Sci* 1988; 522: 638-661.
- Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia, part II: mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992; 77: 337-354.
- Sim MK, Choo MH, Qui XS. Degradation of angiotensin I to [des-Asp<sub>1</sub>]angiotensin I by a novel aminopeptidase in the rat. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1043-1046.
- Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Von Sonntag C. *Oxygen radicals in biology and medicine*. New York, Plenum Press 1989.

Sims NR. Energy metabolism, oxidative stress and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 1996; 5: 435-440.

Simson PE, Criswell HE, Breese GR. Ethanol potentiates  $\gamma$ -aminobutyric acid-mediated inhibition in the inferior colliculus: Evidence for local ethanol/ $\gamma$ -aminobutyric acid interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 1991a; 259: 1288-1293.

Simson PE, Criswell HE, Johnson KB, Hicks RE, Breese GR. Ethanol inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 1991b; 257: 225-231.

Sinclair JG, Lo GF. Ethanol blocks tetanic and calcium-induced long-term potentiation in the hippocampal slice. *Gen Pharmac* 1986; 17: 231-233.

Singh H, Kalnitsky G.  $\alpha$ -N-benzoylarginine- $\beta$ -naphthylamide hidrolase, an aminopeptidase from rabbit lung. *J Biol Chem* 1980; 255: 369-374.

Sjöholm I, Yman L. Degradation of oxytocin, lysine vasopressin, angiotensin II, and andgiotensin II amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase). *Acta Pharm Suec* 1967; 4: 65-76.

Skoog I. A review on blood pressure and ischaemic white matter lesions. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1998; 9: 113-119.

Slater TF, Sawyer B, Strauli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963; 77: 383-393.

Smith MA, Chick JD, Engleman HM, Kean DM, Douglas RHB, Best JJK. Brain hydration during alcohol measured by magnetic resonance imaging. *Drug Alcohol Depend* 1985; 21: 25-28.

Smith PB. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 219-227.

Smith-Swintosky VL, Mattson MP. Glutamate, beta-amyloid precursor proteins, and calcium mediated neurofibrillary degeneration. *J Neural Transm Suppl* 1994; 44: 29-45.

Smothers CT, Clayton R, Blevins T, Woodward JJ. Ethanol sensitivity of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurochem Int* 2001; 38: 333-340.

Snell LD, Iorio KR, Tabakoff B, Hoffman PL. Protein kinase C activation attenuates N-methyl-D-aspartate-induced increases in intracellular calcium in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1994a; 62: 1783-1789.

Snell LD, Nunley KR, Lickteig RL, Browning MD, Tabakoff B, Hoffman PL. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Mol Brain Res* 1996a; 40: 71-78.

Snell LD, Szabo G, Tabakoff B, Hoffman PL. Gangliosides reduce the development of ethanol dependence without affecting ethanol tolerance. *J Pharmac Exp Ther* 1996b; 279: 128-136.

Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Involvement of protein kinase C in ethanol-induced inhibition of NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1994b; 18: 81-85.

Solhonne B, Gros C, Pollard H, Schwartz JC. Major localization of aminopeptidase M in rat brain microvessels. *Neuroscience* 1987; 22: 225-232.

Solomon RL. The opponent-process theory of acquired motivation. *Am Psychol* 1980; 35: 691-712.

Solomon RL, Corbit JD. An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of effect. *Psychol Rev* 1974; 81: 119-145.

Song L, Wilk S, Healy DP. Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II induced dipsogenic and pressor responses. *Brain Res* 1997; 744: 1-6.

Sonnenberg JL, Mitchelmore C, McGregor-Leon PF, Hemstead J, Morgan JI, Curran T. Glutamate receptor agonists increase the expression of *fos*, *fra* and *ap-1* DNA binding activity in mammalian brain. *J Neurosci Res* 1989; 24: 72-80.

Spackman DH, Smith EL, Brown DM. Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J Biol Chem* 1955; 212: 255-269.

Squire LR, Amaral DG, Press GA. Magnetic resonance imaging of the hippocampal and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *J Neur* 1990; 10: 3106-3117.

Stahl WL. (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase function, structure and conformations. *Ann Neurol* 1984; 16: S121-S127.

Stahl WL. The Na/K ATPase of nervous tissue. *Neurochem Int* 1986; 8: 449-476.

Stanley PE. A survey of more than 90 commercially available luminometers and imaging devices for low-light measurements of chemiluminescence and bioluminescence, including instruments for manual, automatic and specialized operation, for HPLC, LC, GLC and microtitre plates. Part 1: Descriptions. *J Biolumin Chemilumin* 1992a; 7: 77-108.

Stanley PE. A survey of more than 90 commercially available luminometers and imaging devices for low-light measurements of chemiluminescence and bioluminescence, including instruments for manual, automatic and specialized operation, for HPLC, LC, GLC and microtitre plates. Part 2: Photographs. *J Biolumin Chemilumin* 1992b; 7: 157-69.

Starke PE, Oliver CN, Stadtman ER. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *FASEB J* 1987; 1: 36-39.

Stewart J, Badiani A. Tolerance and sensitization to the behavioral effect of drugs. *Behav Pharmac* 1993; 4: 289-312.

Stewart J, Druhan JP. Development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801. *Psychopharmacology* 1993; 110: 125-132.

Stewart J, Eikelboom R. Conditioned drug effects. En: *Handbook of Psychopharmacology*. Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH (eds). New York, Plenum Press 1987; 1-57.

Stone TW. *Neuropharmacology*. Oxford, University Press 1995.

Stone TW, Connick JH. Quinolinic acid, other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience* 1985; 15: 597-617.

Streissguth AP, Barr HM, Martin DC, Herman CS. Effects of maternal alcohol, nicotine and caffeine use during pregnancy on infant mental and motor development at eight months. *Alcohol Clin Exp Res* 1980a; 4: 152-164.

Streissguth AP, Barr HM, Olson H, Sampson PD, Bookstein FL, Burggess DM. Drinking during pregnancy decreases word attack and arithmetic scores on standardized tests: Adolescent data from a population-based prospective study. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 248-254.

Streissguth AP, Barr HM, Sampson PD. Moderate prenatal alcohol exposure: Effects on child IQ and learning problems at 7½ years. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 662-669.

Streissguth AP, Bookstein FL, Sampson PD, Barr HM. Attention: Prenatal alcohol and continuities of vigilance and attentional problems from 4 through 14 years. *Dev Psychopathol* 1995; 7: 419-446.

Streissguth AP, Bookstein FL, Sampson PD, Barr HM. The enduring effects of prenatal alcohol exposure on child development, birth through 7 years: A partial least square solution. *International Academy for Research in Learning Disabilities*. Ann Arbor, University of Michigan Press 1993.

Streissguth AP, Landesman-Dwyer S, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980b; 209: 353-361.

Streissguth AP, Martin DC. Prenatal effects of alcohol abuse in human and laboratory animals. En *The pathogenesis of alcoholism*. Kissin B, Begleiter H (eds). New York, Plenum Press, 1983; 539-589.

Streissguth AP, Martin DC, Barr HM, Sandman BM, Kirchner GL, Darby BL. Intrauterine alcohol and nicotine exposure: Attention and reaction time in 4-year-old children. *Dev Psychol* 1984; 20: 533-541.

Strijbos PJLM, Leach MJ, Garthwaite J. Vicious cycle involving Na<sup>+</sup> channels, glutamate release, and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. *J Neurosci* 1996; 16: 5004-5013.

Struys-Ponsar C, Florence A, Gauthier A, Crichton RR, Van den Bosch P. Ultrastructural changes in brain parenchyma during normal aging and in animal models of aging. *J Neural Transm Suppl* 1994; 44: 111-132.

Subarao KV, Richardson JS, Ang LC. Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1990; 55: 342-345.

Sullik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: Embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; 214: 936-938.

Sullivan MJ, Akill H, Blaker D, Barchas JD. Enkephalinase: preliminary characterization and comparison with angiotensin converting enzyme. En: *Endogenous opiate agonist and antagonists*. Way EL (ed). New York, Pergamon Press 1980; 357-360.

Sullivan MJ, Harding JW, Wright JW. Differential effects of aminopeptidase inhibitors of angiotensin-induced pressor responses. *Brain Res* 1988; 456: 249-253.

Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A. Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 110-122.

Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A. Relationship between alcohol withdrawal seizures and temporal lobe white matter volume deficits. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 348-354.

Sun JS, Hang YS, Huang IH, Lu FJ. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 107-112.

Sun XF, Shin C, Windebank AJ. Calmodulin in ischemic neurotoxicity of rat hippocampus *in vitro*. *Neuroreport* 1997; 8: 415-418.

Suszkiv JB, Brecher AS. Brain aminoacyl arylamidase. Further purification of the soluble bovine enzyme and studies on substrate specificity and possible active-site residues. *Biochem* 1970; 9: 4008-4017.

Suzdak PD, Glowa JR, Crawley JN, Schwartz RD, Skonick P, Paul SM. A selective imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* 1986; 234: 1243-1247.

Svehla G. Chemiluminescence immunoassay Wilson and Wilson's comprehensive analytical chemistry. Amsterdam, Elsevier 1992.

Swartzwelder HS, Ferrari S, Anderson WW, Wilson AA. The drug MK-801 attenuates the development, but not the expression, of long-term potentiation and stimulus train-induced bursting in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1989; 28: 441-445.

Szabó G, Hoffman PL, Tabakoff B. Forskolin promotes the development of ethanol tolerance in 6-hydroxydopamine-treated mice. *Life Sci* 1988a; 42: 615-621.

Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Brain monoamines are involved in mediating the action of neurohypophyseal peptide hormones on ethanol tolerance. *Acta Physiol Hung* 1988b; 71: 459-466.

Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Intraventricular administration of neurohypophyseal hormones interferes with the development of tolerance to ethanol. *Acta Physiol Hung* 1989; 73: 97-103.

Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Neurohypophyseal peptides and ethanol tolerance and dependence. *Front Horm Res* 1987; 15: 128-137.

Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. The effects of neurohypophyseal hormones on tolerance to the hypothermic effect of ethanol. *Alcohol* 1985; 2: 567-674.

Szabó G, Tabakoff B, Hoffman PL. The NMDA receptor antagonist dizocilpine differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology* 1994; 113: 511-517.

Tabakoff B, Helleuo K, Hoffman PL. Alcohol. En: Pharmacological aspect of drug dependence. Handbook of experimental pharmacology. Shuster CR, Kuhar MJ (eds). Berlin, Springer 1996; 374-460.

Tabakoff B, Hoffman PL. Adenylyl cyclases and alcohol. En: Advances in second messenger and phosphoprotein research. Cooper DMF (ed). New York, Raven Press 1998; 173-193.

Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 1996a; 16: 909-912.

Tabakoff B, Hoffman PL. Biochemical pharmacology of alcohol. En: Psychopharmacology: The third generation of progress. Meltzer HY (ed). New York, Raven Press 1987; 1521-1526.

Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol and glutamate receptors. En: Pharmacological effects of ethanol on the nervous system. Deitrich RA, Erwin VG (eds). New York, Boca Raton, CRC Press 1996b; 73-93.

Tabakoff B, Melchior CL, Hoffman PL. Commentary on ethanol tolerance. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6: 252-259.

Tabakoff B, Von Wartburg JP. Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: Metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 63: 957-966.

Tagaya M, Matsumoto M, Kitagawa K, Niinobe M, Ohtsuki T, Hata R, Ogawa S, Handa N, Mikoshiba K, Kamada T. Recombinant human superoxide dismutase can attenuate ischemic neuronal damage in gerbils. *Life Sci* 1992; 51: 253-259.

Takahashi R, Edashige K, Sato EF, Inoue M, Matsuno T, Utsumi K. Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 325-330.

Takanashi T, Momiyama A. Different types of calcium channel mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993; 366: 156-158.

Tallan HH, Jones ME, Fruton JS. On the proteolytic enzymes of animal tissues. X beef spleen cathepsin C. *J Biol Chem* 1952; 194: 793-805.

Tareilus E, Breer H. Rapid kinetics of depolarization-induced changes in intrasynaptosomal calcium concentrations. *Neurochem Int* 1992; 20: 275-279.

Tarter RE, Edwards KL. Neuropsychology of alcoholism. En: Alcohol and the brain, chronic effects. Tarter RE, Van Thiel DH (eds). New York, Plenum Medical Book Co. 1985; 217-242.

Taylor CP, Weber ML. Effect of temperature on synaptic function after reduced oxygen and glucose in hippocampal slices. *Neuroscience* 1993; 52: 555-562.

Taylor WL, Dixon JE. Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1978; 253: 6934-6940.

Terwel D, Bothmer J, Wolf E, Meng F, Jolles J. Affected enzyme activities in Alzheimer's disease are sensitive to antemortem hypoxia. *J Neurol Sci* 1998; 161: 47-56.

Thevananther S, Brecher AS. Interactions of acetaldehyde with plasma proteins of the renin-angiotensin system. *Alcohol* 1994; 11: 493-499.

Thomas GJ, Dodd PR, Kril JJ, Harper CG. Alcoholism and aminoacid neurotransmitters in human brain. *Mol Neuropharmacol*. 1992; 2: 215-218.

Thomas MM, Puligandla PS, Dunn SM. Effects of calcium channel blockers on the kinetics of voltage-dependent changes in synaptosomal calcium concentrations. *Brain Res* 1994; 635: 9-17.

Thomas RC. Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 1972; 52: 563-594.

Ticku MK, Lowrimore P, Lehoullier P. Ethanol enhances of GABA induced <sup>36</sup>Cl-influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Res Bull* 1986; 17: 123-126.

Tombaugh GC, Sapolski RM. Mechanistic distinctions between excitotoxic and acidotic hippocampal damage in an in vitro model of ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10: 527-535.

Tomkins DM, Lê AD, Sellers EM. Effect of 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure. *Psychopharmacology* 1995; 117: 479-485.

Torvik A. Brain lesions in alcoholics. Neuropathological observations. *Acta Med Scand* 1987a; 717: 47-54.

Torvik A. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Clin Neuropathol* 1987b; 6: 25-29.

Torvik A, Lindboe CF, Rodge S. Brain lesions in alcoholics. A neuropathological study with clinical correlations. *J Neurol Sci* 1982; 56: 233-248.

Trabert W, Betz T, Niewald M, Huber G. Significant reversibility of alcoholic brain shrinkage within 3 weeks of abstinence. *Acta Psychiat Scand* 1995; 92: 87-90.

- Tremwell MF, Hunter BE. Effects of chronic ethanol ingestion on long-term potentiation remain even after a prolonged recovery from ethanol exposure. *Synapse* 1994; 17: 141-148.
- Trevisan L, Fitzgerald LW, Brose N, Gasic GP, Heinemann SF, Duman RS, Nestler RJ. Chronic ingestion of ethanol upregulates NMDA-RI receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J Neurochem* 1994; 62: 1635-1638.
- Tritschler HJ, Packer L, Medori R. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 34: 169-181.
- Trounce I, Bryne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 1989; 1: 637-639.
- Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Ann J Psychiat* 1995; 152: 332-340.
- Tsukahara T, Ishiura S, Sugita H. An ATP-dependent protease and ingensin, the multicatalytic proteinase, in K652 cells. *Eur J Biochem* 1988; 177: 261-266.
- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Multiple calcium channels types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9518-9522.
- Ulrich C, Hersh LB. Degradation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -neo-endorphin by rat membrane peptidases. *Peptides* 1985; 6: 475-482.
- Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, Hamada M, Takeuchi T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot* 1976; 29: 97-99.
- Uylings HBM, Van Eden CG. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates including humans. En: *Progress in brain*. Uylings CG, Eden EG, De Bruin MA, Feenstra MGP (eds). 1990.
- Uysal M, Kutalp G, Ozdemirler G, Aykacc G. Ethanol-induced change in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. *Drug Alcohol Depend* 1989; 23: 227-230.
- Van Dyke K, McCapra F, Behesti I. *Bioluminescence and chemiluminescence instruments and applications*. Florida, CRC Press 1985.
- Veatch LM, Gonzales LP. Repeated ethanol withdrawal produces site-dependent increase in EEG spiking. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 262-267.
- Veloso D, Passonneau JV, Veech RL. The effects of intoxicating doses of ethanol upon intermediary metabolism in rat brain. *J Neurochem* 1972; 19: 2976-2686.

Verity MA. Cation modulation of synaptosomal respiration. *J Neurochem* 1972; 19: 1305-1318.

Verity MA, Brown WJ, Cheung M. Isolation of ribosome containing synaptosome subpopulation with active in vitro protein synthesis. *J Neurosci Res* 1980; 5: 143-153.

Victor M, Adams RD. The effect of alcohol on the nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1953; 32: 526-573.

Victor M, Adams RD, Collins GH. *The Wernicke-Korsakoff syndrome*. Oxford, Blackwell Scientific 1971.

Victor M, Adams RD, Collins GH. *The Wernicke-Korsakoff syndrome and related disorders due to alcoholism and malnutrition*. Philadelphia; FA Davis 1989.

Victor M, Yakovlev PI. Korsakoff's psychic disorder in conjunction with peripheral neuritis. A translation of Korsakoff's original article with brief comments on the author and his contribution to clinical medicine. *Neurology* 1955; 5: 394-406.

Vigo-Prelfrey C. *Membrane lipid oxidation*. Florida, CRC Press Boca Raton 1990.

Vincent SR, Hope BT. Neurons that say NO. *TINS* 1992; 15: 108-113.

Vogel Z, Alstein M. Degradation of enkephalin by two brain enzymatic activities. En: *Endogenous and exogenous opiate agonist and antagonists*. Way EL (ed). Londres, Pergamon Press 1980; 353-356.

Vogel Z, Alstein M. The adsorption of enkephalin to porous polystyrene beads: A simple assay for enkephalin hydrolysis. *FEBS Letters* 1977; 80: 332-336.

Vogel Z, Alstein M. The effect of puromycin on the biological activity of Leu-enkephalin. *FEBS Letters* 1979; 98: 44-48.

Volkow ND, Wang GJ, Hitzemann R, Fowler JS, Overall JE, Burr G, Wolf AP. Recovery of brain glucose metabolism in detoxified alcoholics. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 53-59.

Volpicelli JR, Davis MA, Olgin JE. Naltrexone blocks the postshock increase of ethanol consumption. *Life Sci* 1986; 38: 841-847.

Volterra A, Trotti D, Gambino G, Racagni G. Convergent inhibition of glutamate uptake by arachidonic acid and oxygen free radicals: molecular mechanisms and relevance to neurodegenerative pathologies. En: *Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunctions*. Racagni G, Brunello N, Langer SL (eds). Karger, Basel 1994; 129-137.

Von Warthurg JP. Pharmacokinetics of alcohol. En: Human metabolism of alcohol. Crow KE, Batt RD (eds). Boca Raton, CRC Press 1989; 9-22.

Von Drass DD, Blumental HD. Dementia of aged: disease or atypical accelerated aging?. Biopathological and psychological perspective. *Ann Geriatr Soc* 1992; 40: 285-294.

Voorhess CV, Mollnow E. Behavioral teratogenesis: Long term influences on behavior from early exposure to environmental agents. En: Handbook of infant development. Osofsky JD (ed). New York, Wiley 1987; 913-971.

Wafford KA, Burnnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofuji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM. Ethanol sensitivity eight amino acids combined in the  $\gamma_{2L}$  subunit of the receptor complex. *Neuron* 1991; 7: 27-33.

Wagner GW, Tavianini MA, Herrmann KM, Dixon JE. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. *Biochemistry* 1981; 20: 3884-3890.

Waldschmidt-Leits E, Purr A. Über proteinase und carboxypolypeptidase aus pankreas (XVII mitterlung zur specifität tierischer proteasen). *Berichte* 1929; 62: 956-962.

Walker DW, Barnes DE, Riley JN, Hunter BE, Zorneyzer SF. The neurotoxicity of chronic alcohol consumption, an animal model. En: Psychopharmacology of ethanol. Sandler M (ed). New York, Raven Press 1980a; 17-31.

Walker DW, Barnes DE, Zorneyzer SF, Hunter BE, Kubanis P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 1980b; 209: 711-713.

Walker DW, Freund G. Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiol Behav* 1971; 7: 773-778.

Walker DW, Freund G. Impairment of timing behavior following prolonged alcohol consumption in rats. *Science* 1973; 182: 597-599.

Wallace DC. Diseases of mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 1992a; 61:1175-1212.

Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?. *Science* 1992b; 256: 628-632.

Walsh KW. Understanding brain damage. A primer of neuropsychological evaluation. Edinburgh, Churchill Livingstone 1985.

Wan FJ, Berton F, Madamba SG, Francesconi W, Siggins GR. Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABA<sub>A</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5049-5054.

Wand GS. Alcohol, the phytothalamic-pituitary-adrenal axis and hormonal tolerance. En: *Alcohol and endocrine system*. Zakhar S (ed). Bethesda, NIH 1993; 251-270.

Wang DC, Taraschi TF, Rubin E, Janes N. Configurational entropy is the driving force of ethanol action on membrane architecture. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1145: 141-148.

Ward HK, Bradford HF. Relative activities of glutamine synthetase and glutaminase in mammalian synaptosomes. *J Neurochem* 1979; 33: 339-342.

Webb EC. Enzyme nomenclature: a personal perspective. *FASEB J* 1993; 7: 1192-1194.

Weeks I, Beheshti I, McCapra F, Campbell AK, Woodhead JS. Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. *Clin Chem* 1983a; 29: 1474-1479.

Weeks I, Campbell AK, Woodhead JS. Two-site immunochemiluminometric assay for human alpha 1-fetoprotein. *Clin Chem* 1983b; 29: 1480-1483.

Weiner JL, Zhang L, Carlen PL. Potentiation of GABA<sub>A</sub>-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J Pharmac Exp Ther* 1994; 268: 1388-1395.

Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmac Exp Ther* 1993; 267: 250-258.

Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytiä P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 1996; 16: 3474-3485.

Wenger JR, Tiffany TM, Bombardier C, Nicholls K, Woods SC. Ethanol tolerance in rat is learned. *Science* 1981; 213: 575-577.

Wenk GL, Pierce DJ, Struble RG, Price DL, Cork LC. Age-related changes in multiple neurotransmitter systems in the monkey brain. *Neurobiol Aging* 1989; 10: 11-19.

West JR, Chen WJ, Pantazis NJ. Fetal alcohol syndrome: The vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab Brain Dis* 1994; 9: 291-322.

West JR, Hamre KM. Effects of alcohol exposure during different periods of development: Changes in hippocampal mossy fibers. *Dev Brain Res*. 1985; 17: 280-284.

Wheler GHT, Bradford HF, Davison AN, Thompson E. Uptake and release of taurine from cerebral cortex slices and their subcellular compartments. *J Neurochem* 1979; 33: 331-337.

White G, Lovinger DM, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not alter GABA-activated current in an isolated adult mammalian neurons. *Brain Res* 1990; 507: 332-336.

Whittaker VP. Structure and function of nervous tissue. Bourne GA (ed). Londres, Academic Press 1969; 1-24.

Whittaker VP. The synaptosome. En: Handbook of neurochemistry. Lajtha A (ed). New York, Plenum Press 1984.

Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJA. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes"). *Biochem J* 1964; 90: 293-303.

Whittington MA, Lambert JD, Little HJ. Increased NMDA receptor and calcium channel activity underlying ethanol withdrawal hyperexcitability. *Alcohol Alcohol* 1995; 30: 105-114.

Wik G, Borg S, Sjogren I, Wiesel FA, Blomqvist G, Borg J, Greitz T, Nyback H, Sedvall G, Stone-Elander S, Widen L. PET determination of regional cerebral glucose metabolism in alcohol-dependent men and healthy controls using <sup>11</sup>C-glucose. *Acta Psychiat Scand* 1988; 78: 234-241.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Purification, characterization and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem* 1998; 273: 15961-15970.

Wilkinson DA. Examination of alcoholics by computed tomographic (CT) scans. A critical reviews. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6: 31-45.

Will B, Heifti F. Behavioral and neurochemical effects of chronic intraventricular injections of nerve growth factor in adult rats with fimbria lesions. *Behav Brain Res* 1985; 17: 17-24.

Williams JH. Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 1989; 341: 739-742.

Williams LR. Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7: 55-73.

Wink DA, Kasprzakj KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Iunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allens JS, Keefer L. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254: 1001-1003.

Wirkner K, Poelchen W, Köles L, Mühlberg K, Scheibler P, Allgaier C, Illes P. Ethanol-induced inhibition on NMDA receptor channels. *Neurochem Int* 1999; 35: 153-162.

Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 243-250.

Wise RA. The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmac Ther* 1987; 35: 227-263.

Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 1987; 94: 469-492.

Wise RA, Newton P, Leeb K, Burnette B, Pocock D, Justice JB. Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 1995; 120: 10-20.

Wise RA, Romprè PP. Brain dopamine and reward. *Ann Rev Psychol* 1989; 40: 191-225.

Witek B, Kolataj A. Effect of ethanol administration on activities of some lysosomal hydrolases in the mouse. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 163-168.

Witz G, Lawrie NJ, Zaccaria A, Ferran HE Jr, Goldstein BD. The reaction of 2-thiobarbituric acid with biologically active alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1986; 2: 33-39.

Wolff SP, Garner A, Dean RT. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS* 1986; 11: 27-31.

Woodward JJ. A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartic acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1994; 62: 987-991.

Woodward JJ. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem Int* 1999; 35: 93-94.

Woodward JJ, Gonzales RA. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: Reversal by glycine. *J Neurochem* 1990; 54: 712-715.

Worral M, Williams C. Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: A review of recent developments. *Biochem J* 1994; 297: 425-436.

Wozniak KM, Pert A, Linnoila M. Antagonism of 5-HT<sub>3</sub> receptors attenuates the effects of ethanol on extracellular dopamine. *Eur J Pharmacol* 1990; 187: 287-289.

Wright B, Zeidman I, Greig R, Poste G. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonist. *Cell Immunol* 1985a; 95: 46-53.

Wright J, Sullivan MJ, Harding JW. Dysfunction of central angiotensinergic aminopeptidase activity in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 1985b; 61: 351-356.

Wright JM, Peoples RW, Weight FF. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated current in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; 738: 249-256.

Wright JW, Amir HZ, Murray CE, Roberts KA, Harding JW, Mizutani S, Ward PE. Use of aminopeptidase M as a hypotensive agent in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1991; 27: 545-551.

Wright JW, Harding JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Rev* 1997; 25: 96-124.

Wright JW, Quirk WS, Hanesworth JM, Harding JW. Influence of aminopeptidase inhibitors on brain angiotensin metabolism and drinking in rats. *Brain Research* 1988; 441: 215-220.

Wu PH, Mihic SJ, Liu JF, Lê AD, Kalant H. Blockade of chronic tolerance to ethanol by NMDA antagonist, (+)-MK-801. *Eur J Pharmacol* 1993; 231: 157-164.

Wymann MP, Von Tscherner V, Deranleau DA, Baggiolini M. Chemiluminescence detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by human neutrophils during the respiratory burst. *Anal Biochem* 1987; 165: 371-378.

Yamaguchi K, Negoro H, Hama H, Kamoi K, Sakaguchi T. A comparison between the effects of angiotensin II and angiotensin III injected into the third cerebral ventricle on vasopressin secretion in conscious rats. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1979; 55: 1286-1279.

Yamanaka Y, Kono S. Brain catecholamine turnover in alcoholic mice. *Hiroshima J Med Sci* 1974; 23: 105-113.

Yang X, Criswell HE, Simson P, Moy S, Breese GR. Evidence for a selective effects of ethanol on N-methyl-D-aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 114-124.

Yen TC, Chen YS, King KL, Ye SH, Wei YH. Liver mitochondrial respiration functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 994-1003.

Yingst DR. Modulation of the Na,K-ATPase by Ca and intracellular proteins. *Ann Rev Physiol* 1988; 50: 291-303.

Yoshimura M, Tabakoff B. Selective effects of ethanol on the generation of cAMP by particular members of the adenylyl cyclase family. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1435-1440.

Young AM, Bradford HF. N-methyl-D-aspartate releases excitatory amino acids in the corpus striatum *in vivo*. *J Neurochem* 1991; 56: 1677-1683.

Yu DH, Zhang L, Eisele JL, Bertrand D, Changeux JP, Weight FF. Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha-7-receptors involves the amino terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1010-1016.

Yurttas L, Dale BE, Klem WR. FTIR evidence for alcohol binding and dehydration in phospholipid and ganglioside micelles. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 863-869.

Zhang F, Chiodo LA, Freeman AS. Electrophysiological effect of MK-801 on rat nigrostriatal and mesoaccumbal dopaminergic neurons. *Brain Res* 1992; 590: 153-163.

Zhang L, Oz M, Stewart RR, Peoples RW, Weight FF. Volatile general anaesthetic actions on recombinant nACh(alpha 7), 5-HT3 and Chimeric nACh(alpha7)-5-HT3 receptors expressed in xenopus oocytes. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 353-355.

Zilles K, Wree A. Cortex: Areal and laminar structure. The rat nervous system. Paxinos G (ed). Australia, Academic Press 1985; 375-415.

Zimatkin SM, Deitrich RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addict Biol* 1997; 2: 387-399.

Zimmermann H. Signalling via ATP in the nervous system. *TINS* 1994; 17: 420-426.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11968-11973.

Zou JY, Martínez DB, Neafsey EJ, Collins MA. Binge ethanol-induced brain damage in rats: effect of inhibitors of nitric oxide synthase. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1416-1411.

Zucchelli GC, Pilo A, Masini S, Chiesa MR, Masi A. Methodological evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for thyrotropin using acridinium ester-labelled antibody. *J Biolumin Chemilumin* 1989; 4: 620-626.

