
Particularidades en los mecanismos de adicción al etanol

Mecanismos neuroenzimáticos de acción del alcohol: papel del acetaldehído

M. Miquel

Área de Psicobiología, Universitat Jaume I, Castelló de la Plana.

Introducción a la hipótesis del acetaldehído

La hipótesis del acetaldehído es ya antigua^{1,2}. Dicha hipótesis plantea que algunos de los efectos del alcohol son debidos al acetaldehído, su primer metabolito oxidativo. Esta hipótesis aparece como una alternativa explicativa a los problemas surgidos en la descripción de los mecanismos de acción del etanol. Especialmente, aquellos que serían la causa de los cambios observados en la conducta tras el consumo de alcohol.

El etanol, como otras drogas de abuso, a través de sus acciones en diversos sistemas de neurotransmisión cerebral, produce efectos fisiológicos y afecta a diversos patrones de conducta^{3,4}. No obstante, debido a que su molécula carece de un carbono asimétrico la interacción con estos sistemas cerebrales no es estereoselectiva⁵. Esta característica molecular diferencia al etanol de otras drogas de abuso, cuyo mecanismo de acción queda bien descrito por interacciones ligando-receptor. La falta de estereoselectividad ha complicado la descripción de su mecanismo de acción en las neuronas.

El acetaldehído, si bien es también una molécula estructuralmente simple, es mucho más reactiva que su precursor. Se ha demostrado que debido a la reacción del grupo carbonilo de la molécula de acetaldehído con los grupos nucleofílicos de los aminoácidos forma macromoléculas con éstos, pudiendo modificar así la fisiología celular y producir múltiples efectos en el sistema nervioso central (SNC)⁶.

En la exposición que sigue a continuación me propongo analizar la viabilidad del acetaldehído como una sustancia neuroactiva, explicar los mecanismos enzimáticos del alcohol y su existencia en el SNC y, finalmente, exponer cuáles son las pruebas que actualmente avalan la hipótesis del acetaldehído.

El acetaldehído como sustancia neuroactiva

Efectos sobre la fisiología neuronal

El acetaldehído afecta a la fisiología de diversos sistemas cerebrales e induce en ellos cambios moleculares⁷⁻¹⁸. Hace más de dos décadas que se demostró la capacidad del acetaldehído para promover la liberación de noradrenalina en terminales del sistema nervioso periférico⁷ y en el SNC^{8,9}. Resultados similares a los referidos para la noradrenalina se han constatado para la serotonina y la dopamina¹⁰. Respecto a esta última, se observó que el acetaldehído mimetizaba, aunque con mayor velocidad, el incremento de ácido 3,4-dihidroxifenilacético inducido por etanol en el estriado¹¹. El acetaldehído es, así mismo, capaz de promover la liberación de β -endorfinas en cultivos celulares hipotalámicos¹²⁻¹⁴.

La regulación del eje hipotalámico-hipofisario-corticoadrenal puede ser también alterada por el acetaldehído. En un grupo de experimentos en los que se trataba a ratas con alcohol y cianamida sódica, un potente inhibidor de la enzima aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH), se observaron fuertes incrementos de la corticosterona y elevaciones de los niveles de ácido ribonucleico de la hormona CRF y del neuropéptido propiomelanocortina en el núcleo paraventricular del hipotálamo¹⁵. Así mismo, con este tratamiento, que eleva los niveles de acetaldehído, se afectó la expresión del factor genético de transcripción c-fos en el hipotálamo paraventricular¹⁶.

Otro dato muy interesante es el relacionado con los efectos del acetaldehído sobre el proceso de la potenciación a largo plazo del giro dentado. El acetaldehído, administrado en los ventrículos laterales, reprodujo con diez veces más potencia el efecto inhibidor del etanol sobre este proceso de neuroplasticidad¹⁷. El mismo efecto fue observado inyectando a las ratas alcohol y un inhibidor de la ALDH¹⁸.

Efectos del acetaldehído en la conducta

La acumulación periférica de acetaldehído ha sido tradicionalmente descrita como aversiva^{1,19,20}. Esta cualidad aversiva ha sido la base de las terapias antialcohólicas con distintos inhibidores de la ALDH^{1,19,20}. No obstante, ya desde el inicio de estas prácticas terapéuticas, algunos informes indicaban que no sólo los sujetos así tratados no dejaban de beber alcohol, sino que cuando ingerían dosis moderadas de la droga, sentían mayor euforia y mayores efectos calificados de placenteros^{1,21}. Así mismo, se observó que la exacerbación del ánimo y la locuacidad de la que estos sujetos informaban correlacionaba positivamente con los niveles de acetaldehído en sangre^{1,21}.

En animales de laboratorio el acetaldehído actúa, al igual que el etanol, como una sustancia reforzante que afecta a la conducta motivada y permite establecer asociaciones condicionadas. Hace más de tres décadas se demostró que la administración de infusiones de acetaldehído aumentaba el consumo posterior de etanol en ratas²². Desde la década de 1980, sabemos también que el acetaldehído es autoadministrado por animales de laboratorio en el ventrículo o intravenosamente mediante una respuesta operante²²⁻²⁴.

Mucho más recientemente se ha observado que la autoadministración cerebral de acetaldehído pudiera estar regionalizada en la zona posterior del área tegmental ventral. Desplazamientos rostrales de la cánula no permiten ver este efecto²⁵. Un estudio previo del mismo grupo de investigación había descrito la misma localización para la autoadministración de alcohol en ratas Wistar²⁶.

El acetaldehído puede considerarse también como un potente estímulo incondicionado capaz de generar asociaciones pavlovianas. Estudios de la década de 1980 demostraron que su administración intracerebroventricular producía preferencia de lugar en ratas, fenómeno muy difícil de observar con la administración de alcohol²⁷. En la misma línea, una investigación reciente indica que el acetaldehído puede inducir, a diferencia del etanol, una preferencia por el lugar en el que fue administrado en presencia de una señal olfatoria²⁸.

La estimulación locomotora típica de todas las drogas adictivas también ha sido observada con infusiones intracerebroventriculares de acetaldehído y de etanol^{29,30}. El efecto activador del acetaldehído se produce, tanto después de una infusión aguda, como tras un tratamiento crónico con esta sustancia.

En resumen, tanto los estudios fisiológicos como de conducta permiten concluir que el acetaldehído es una sustancia neuroactiva cuyos efectos sobre los patrones de conducta lo asemejan al etanol y a las demás drogas de abuso.

Una de las cuestiones clave para la viabilidad de la hipótesis del acetaldehído es de dónde procede el acetaldehído que se encuentra presente en el SNC. Analicemos, por tanto, el mecanismo metabólico del etanol y los sistemas orgánicos en los que éste tiene lugar.

Metabolismo oxidativo del alcohol

Oxidación hepática del alcohol

El etanol se metaboliza fundamentalmente en acetaldehído por oxidación enzimática. En las situaciones de consumo oral, este proceso acontece principalmente en el hígado y se halla fundamentalmente mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (alcohol: NAD-oxidoreductasa, EC 1.1.1.1)³¹. Otros dos sistemas enzimáticos hepáticos posibilitan la misma reacción y adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema de la ADH. Estos dos sistemas son el llamado sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno (compuesto I)³¹. En un segundo paso el acetaldehído producido es metabolizado a acetato principalmente por la ALDH (EC 1.2.1.3). También existen indicios claros de la existencia de un metabolismo oxidativo extrahepático del etanol en diferentes órganos corporales, tales como el corazón, el estómago³² y los riñones³³.

El acetaldehído periféricamente formado difícilmente puede alcanzar el SNC. En primer lugar, porque en el hígado la ALDH2 mitocondrial es una enzima extremadamente eficaz que reduce al mínimo la posibilidad de que exista acetaldehído circulante³⁴. En segundo lugar, porque en la barrera hematoencefálica existe una importante vía de degradación de acetaldehído, mediada por una ALDH con una baja Km, que la hace muy eficiente a concentraciones muy pequeñas de acetaldehído³⁴. Para que el acetaldehído, por tanto, pueda reaccionar con el sustrato neuronal debiera producirse directamente en el SNC.

Oxidación del alcohol en el sistema nervioso central

La posibilidad de un metabolismo oxidativo del etanol en el cerebro fue cuestionada durante muchos años, dada la dificultad de evaluar los nive-

les de acetaldehído en este tejido³⁵. Hay que tener en cuenta que las cantidades de acetaldehído producidas durante un consumo normal de alcohol son tan pequeñas que difícilmente pueden ser medidas mediante los métodos cromatográficos de que disponemos hasta ahora. Por ejemplo, la administración gástrica a ratas de una dosis de etanol tan elevada como 4,5 g/kg produce 30 min después unas concentraciones en el líquido intersticial de la zona del caudado y del hipocampo de 96 mM de etanol y 10 μ M de acetaldehído. A partir de estos parámetros se ha estimado que esto correspondería a 5 nmol/g si se realizara la detección en un homogeneizado de cerebro³⁶.

No obstante, actualmente tenemos numerosas pruebas de la oxidación enzimática de alcohol en el tejido neuronal³⁷⁻⁴⁰. En el caso del cerebro el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado, y parece ser un tanto diferente. De hecho, la importancia relativa de los sistemas enzimáticos parece variar notablemente en el cerebro respecto al hígado. Así, hasta el momento, no se ha podido demostrar la funcionalidad de la isoforma I de ADH en el cerebro⁴¹. En el cerebro humano, y también en el de roedor, la isoforma más abundante de esta enzima es la clase III⁴². Sin embargo, esta isoforma tiene baja afinidad por el etanol y difícilmente es activada por éste; incluso en intoxicaciones etílicas graves no se alcanzan las concentraciones necesarias para que su contribución sea relevante⁴⁰.

También se ha descrito la presencia de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS, y, en concreto, se ha demostrado que el CYP450 cerebral es inducido por el etanol, como ocurre en el hígado^{41,43}. Esta inducción ha sido asociada con la aceleración de la lipíperoxidación y con los efectos tóxicos del etanol sobre las membranas neurales⁴⁴. No obstante, en la actualidad no existe ningún dato concluyente sobre la relevancia funcional de la oxidación citocromal del etanol.

Finalmente, un gran número de pruebas avalan la presencia y viabilidad funcional del sistema catalasa-peróxido de hidrógeno en el SNC^{1,2,45}. Numerosas investigaciones han demostrado la formación del acetaldehído tras la incubación del tejido neuronal con etanol^{13,37,39,40,45}. Así mismo, existen pruebas de que esta formación de acetaldehído en el cerebro de rata se produce en un proceso oxidativo mediado por el sistema enzimático catalasa-peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, la inhibición de la enzima con carbamida de calcio o con 3-amino-1,2,4-triazol puede prevenirse por la administración previa de etanol a homogeneizados cerebrales^{37,45}. Esta protec-

ción de la inhibición de la catalasa implica que en el tejido neuronal el alcohol es capaz de unirse a la enzima e impedir la acción de los inhibidores irreversibles, y, por tanto, apoya la capacidad del tejido neuronal para oxidar etanol. Asimismo, la administración *in vivo* de AT o cianamida a roedores bloquea de manera dependiente de la dosis la producción de acetaldehído después de que los homogeneizados cerebrales de estos animales se incuben con etanol³⁹.

Un dato adicional procede de la comparación entre ratas recién nacidas y ratas adultas respecto a su capacidad de producción de acetaldehído. Dicha producción es más elevada en los homogeneizados cerebrales de las crías, los cuales demuestran tener más actividad catalasémica⁴⁶. Igualmente, la producción de acetaldehído en cerebros de ratones acatalasémicos de la cepa C3HA es significativamente menor que la que tienen los cerebros procedentes de ratones con niveles control de catalasa⁶. Finalmente, es importante destacar que la acumulación de acetaldehído resulta más prominente en aquellas estructuras cerebrales donde se encuentra más cantidad de catalasa⁴⁷.

Efectos de las manipulaciones del sistema enzimático de la catalasa sobre los cambios de conducta provocados por el alcohol

Partiendo de la evidencia neuroquímica que presenta la enzima catalasa como una de las vías de producción de acetaldehído en el SNC, algunos laboratorios, entre los que se encuentra el nuestro, han estudiado los efectos de distintas manipulaciones de la catalasa en los cambios de conducta producidos por el alcohol. El objetivo de dichos trabajos es dilucidar en qué medida estos cambios de conducta dependen del acetaldehído producido cerebralmente, a través de la oxidación catalasémica del etanol. En los párrafos que vienen a continuación me centraré exclusivamente en la explicación de los datos aportados por nuestro laboratorio.

Nuestros estudios han sido abordados fundamentalmente con estrategias farmacológicas de inhibición e inducción de la actividad del sistema enzimático de la catalasa-H₂O₂. En la actualidad, estamos desarrollando estudios con compuestos que inactivan el acetaldehído producido.

Inhibición de la catalasa y conducta inducida por alcohol

El objetivo de los estudios de inhibición ha sido demostrar que sea cual fuere el mecanismo de

inhibición mediante el que el compuesto inhibe la enzima catalasa, las consecuencias funcionales de dicha inhibición son similares. Los trabajos experimentales se han llevado a cabo con dos inhibidores no competitivos de la enzima: el AT y la cianamida sódica; un inhibidor competitivo: la acida sódica y el plomo crónicamente administrado, cuyo mecanismo de inhibición no ha sido adecuadamente descrito. En todos los casos, nuestros trabajos demuestran que la inhibición de la catalasa es suficiente para bloquear los efectos estimulantes en la conducta locomotora de ratones⁴⁸⁻⁵¹ de una administración aguda de etanol. En estos estudios, el curso de la inhibición de la catalasa que se describe es paralelo a las consecuencias que estas inhibiciones tienen en la conducta locomotora inducida por el alcohol. Además, existe un efecto reductor aditivo cuando se trata a los animales con dos inhibidores⁵⁰. Este bloqueo es específico para la estimulación producida por el alcohol, porque ni la actividad inducida por d-anfetamina, ni la del ter-butanol, un alcohol que no es oxidado por el sistema de la catalasa, son afectadas por las manipulaciones antes descritas^{49,50}. La inhibición de la catalasa también potencia el efecto narcótico del alcohol en ratones⁵².

El alcohol, crónicamente administrado, produce una serie de neuroadaptaciones en los circuitos responsables de la motivación y la emoción⁵³. En roedores, una de las manifestaciones conductuales de estas neuroadaptaciones es la sensibilización al efecto inductor de la locomoción con el tratamiento repetido de alcohol⁵⁴⁻⁵⁶. En este sentido, se ha demostrado que el etanol se comporta como las demás drogas. En un estudio en fase de publicación hemos demostrado que la inhibición de la catalasa bloquea el desarrollo y expresión de la sensibilización locomotora al alcohol⁵⁷.

Inducción de la catalasa y conducta inducida por alcohol

Otra estrategia farmacológica llevada a cabo por este laboratorio ha consistido en la inducción de la enzima catalasa. Esta inducción se ha realizado con dos herramientas diferentes. Por un lado, se ha aprovechado la regulación al alza que la catalasa exhibe tras la terminación de un tratamiento crónico con cianamida sódica⁵⁸. Igualmente, dicha inducción se ha conseguido tras un periodo de 7 días posterior a una inyección aguda de plomo^{59,60}. En todos los casos, la inducción de la actividad de la enzima catalasa en homogeneizados de cerebro de ratón se correlacionó

con la potenciación del efecto estimulante del etanol en la locomoción⁵⁸⁻⁶⁰. También en estos trabajos la potenciación del efecto es específica para el alcohol, y no fue observada con otras drogas inductoras de la actividad locomotora.

En otro estudio se siguió una estrategia mixta, induciendo inicialmente la catalasa con plomo y produciendo, a continuación, la inhibición de la enzima con AT⁶¹. Una vez más pudimos constatar la relación entre las consecuencias de la manipulación inductora e inhibidora de la catalasa y los cambios inducidos por el alcohol. La inhibición de la catalasa redujo de forma dependiente de la dosis el aumento de los efectos del etanol conseguida por el tratamiento previo con plomo.

La oxidación del etanol mediante el sistema de la catalasa depende de los niveles de H₂O₂ presentes que actúan como un factor limitante, ya que en ausencia de H₂O₂, la catalasa no forma compuesto I y no es capaz de oxidar el etanol³⁷. Así pues, una alternativa para la inducción metabólica y, por tanto, para la elevación de los niveles de acetaldehído cerebral, es la modificación del ambiente oxidativo del cerebro. Un trabajo reciente de nuestro laboratorio⁶² demuestra que la generación de especies de oxígeno reactivas observada después de una exposición a hiperoxia, induce el sistema enzimático de la catalasa en cerebro de ratón y, así mismo, incrementa el efecto estimulante que en la conducta locomotora de estos animales produce el alcohol.

A partir de los datos discutidos, se puede afirmar que la implicación del binomio catalasa-acetaldehído en el mecanismo de acción del alcohol posee un respaldo importante en la actualidad. No obstante, la implicación del acetaldehído en los efectos del etanol requiere aún muchas otras pruebas adicionales.

Localización neuroanatómica del metabolismo catalasémico y su relación con los cambios de conducta producidos por el alcohol

Estudios inmunohistoquímicos^{63,64} han puesto de relieve que la catalasa se sitúa fundamentalmente en los cuerpos de neuronas catecolaminérgicas del troncoencéfalo y también en ciertos tipos de glía de las mencionadas áreas, por tanto el número total de células neurales con alta concentración de catalasa (a los mismos niveles que en los hepatocitos) es muy pequeña en relación con el total del cerebro. Esto explicaría los bajos niveles de actividad detectados en homogeneizados cerebrales de rata^{39,40}. Por otro lado, la localización de las neuronas que contienen alta den-

sidad de catalasa contrasta notablemente con localizaciones previamente realizadas para la ALDH^{65,66}. Sin embargo, tomados en su conjunto, estos datos sugieren que aunque la cantidad total de acetaldehído que pueda producirse en el encéfalo a través de la catalasa sea pequeña, existe la posibilidad de que se produzcan acumulaciones de acetaldehído suficientes para provocar cambios en la fisiología y la actividad de determinados grupos neuronales. De esta forma, aunque solamente cantidades muy pequeñas de alcohol sean oxidadas en el cerebro, la generación local de acetaldehído pudiera tener importantes consecuencias funcionales.

Una de las estructuras cerebrales en las que pudiera acontecer esta oxidación local es el núcleo arqueado del hipotálamo. En este núcleo se ha descrito alta densidad de catalasa⁶⁴, pero no se ha encontrado especial densidad de ALDH⁶⁶. Por tanto, es posible que la producción de acetaldehído en el núcleo arqueado fuera relevante funcionalmente. Algunos de los trabajos que hemos desarrollado en los últimos años han ido dirigidos a describir la relevancia funcional de este núcleo en los efectos estimulantes del alcohol. La lesión del núcleo arqueado con monosodio glutamato bloquea de forma específica el efecto estimulante de una inyección de alcohol⁶⁷. Esta misma lesión previene, además, el desarrollo de sensibilización locomotora al etanol, pero no altera la sensibilización a los psicoestimulantes⁶⁸. Es importante destacar que los efectos del etanol, bloqueados por la lesión del núcleo arqueado, parecen estar ligados a las proyecciones β -endorfinas originadas en dicho núcleo, ya que una lesión restringida a estas proyecciones, mediante estradiol valerato, bloquea igualmente el efecto de estimulación de una inyección aguda de alcohol en ratones hembra⁶⁹. Corroborando el papel de las proyecciones β -endorfinas en los efectos del alcohol, Sanchis y Aragón⁷⁰ han demostrado que la administración de AT antes de una inyección aguda de alcohol bloquea la reducción en los niveles sanguíneos de LH que el alcohol produce. Este efecto del alcohol está mediado por la liberación de β -endorfinas⁷¹.

Nuevas estrategias de investigación en la hipótesis del acetaldehído

Una de las lagunas más evidentes en los datos hasta ahora obtenidos se refiere a la implicación del acetaldehído, centralmente producido, en los cambios moleculares que se han descrito tras la administración de etanol. La descripción de es-

tos cambios es fundamental para entender cómo las drogas de abuso generan neuroadaptaciones estables. Un primer escalón imprescindible en estas alteraciones moleculares parece ser la inducción de factores de transcripción génica⁴⁴. Otro paso necesario para demostrar la implicación del acetaldehído en los efectos del etanol consiste en la desactivación del acetaldehído una vez ha sido producido. Ambas líneas de investigación han sido abiertas en nuestro laboratorio y están siendo exploradas en la actualidad por diferentes miembros del equipo. Resultados preliminares nos permiten concluir que la desactivación del acetaldehído mediante un compuesto capaz de producir aductos estables con éste, la D-penicilamina, bloquea también el efecto estimulante de una administración aguda de alcohol.

Reconocimientos

Muchos de los datos discutidos en el presente manuscrito han sido obtenidos por los miembros del laboratorio de Psicofarmacología del Alcohol de la Universidad Jaume I de Castellón. Este laboratorio está dirigido por el Dr. Carlos G. Aragón y está formado por los siguientes miembros: Mercè Correa Sanz, Carles Sanchis-Segura, Juan José Canales, Laura Font Hurtado, Héctor Marín Manrique, Raúl Pastor Medall, y yo misma. Así mismo, contamos con la imprescindible asistencia técnica de Alicia Dosda y Gemma Caballero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith BR, Aragon CMG, Amit Z. Catalase and the production of central acetaldehyde: A possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addict Biol* 1997; 2: 277-289.
2. Zimatkin SM, Liopo AV, Deitrich RA. Distribution and kinetics of ethanol metabolism in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 1623-1627.
3. Weiss F, Koob GF. *Neuropharmacology of ethanol*. En: Meyer R et al, eds. *Neuropharmacology of ethanol*. Birkhäuser: New Approaches, 1995; 125-151.
4. Mihic SJ, Harris RA. Alcohol actions at the GABA_A receptor/chloride channel complex. En: Deitrich RA, Erwin VG, eds. *Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996; 51-72.
5. Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress Neurobiol* 1998; 56: 385-431.
6. Sorrell MF, Tuma DS. Functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. *Ann NY Acad Sci* 1987; 492: 50-62.

7. Walsh MJ. Role of acetaldehyde in the interactions of ethanol with neuroamines. En: Roach MK et al, eds. *Biochemical aspects of alcohol*. Texas: University of Texas Press, 1971; 233-266.
8. Truitt EB, Walsh MJ. The role of acetaldehyde in the actions of ethanol. En: Kissin B, Begleiter H, eds. *The biology of alcoholism*. Nueva York: Plenum Press, 1971; 1: 161-195.
9. Thadani PV, Truitt EB. Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinephrine in rat brain. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 1147-1150.
10. Ortiz A, Griffiths PJ, Littleton JM. A comparison of the effects of chronic administration of ethanol and acetaldehyde to mice: Evidence for a role of acetaldehyde in ethanol dependence. *J Pharmacy Pharmacol* 1974; 6: 349-360.
11. Barbaccia ML, Bosio A, Spano PF, Trabucchi M. Ethanol metabolism and striatal dopamine turnover. *J Neural Transmiss* 1982; 53: 169-177.
12. Reddy BV, Sarkar DK. Effect of alcohol, acetaldehyde and salsolinol on b-endorphin secretion from the hypothalamic neurons in primary cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 161-1267.
13. Reddy BV, Boyadjeva N, Sarkar DK. Effect of ethanol, propranol, butanol and catalase enzyme blockers on b-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: Evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of b-endorphin release. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 339-344.
14. Pastoric M, Boyadjieva N, Sarkar DK. Comparison of the effects of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and b-endorphin secretion from hypothalamic neurons in primary cultures. *Mol Cel Neurosci* 1994; 5: 580-586.
15. Kinoshita H, Jessop D, Finn DP, Coventry TL, Roberts DJ, Ameno K et al. Acetaldehyde, a metabolite of ethanol, activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Alcohol Alcohol* 2001; 36: 59-64.
16. Kinoshita H, Jessop D, Roberts DJ, Ameno K, Ijiri I, Hisida S et al. Effects of acetaldehyde on c-fos mRNA induction in the paraventricular nucleus following ethanol administration. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 432-435.
17. Abe K, Sugiura M, Yamaguchi S, Shoyama Y, Saito H. Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res* 1999; 851: 287-289.
18. Abe K, Yamaguchi S, Sugiura M, Saito H. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1805-1810.
19. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review. *Alcohol* 1996; 13: 147-151.
20. Eriksson CJP. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 25, 5: 15S-32S.
21. Peachey JE, Brien JF, Loomis CW, Rogers BJ. A study of the calcium carbimide-ethanol interaction in man: Symptom responses. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4: 32-329.
22. Myers RD, Veale WL. Alterations in volitional alcohol intake produced in rats by chronic intraventricular infusions of acetaldehyde, paraldehyde or methanol. *Arch Int Pharmacodyn* 1969; 180: 100-113.
23. Myers WD, Ng K, Singer G. Ethanol preference in rats with a prior history of acetaldehyde self-administration. *Experientia* 1984; 40: 1008-1010.
24. Brown ZW, Amit Z, Smith BR. Intraventricular self-administration of acetaldehyde but not ethanol, in naive laboratory rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1979; 64: 271-276.
25. Rodd-Henricks ZA, Zaffaroni A, Goldstein A, McBride WJ, Li TK. The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 55-64.
26. Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM, McBride WJ. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 149: 217-224.
27. Smith BR, Amit Z, Splawinsky J. Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol* 1984; 1: 193-195.
28. Quetermont E, De Witte PD. Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 68: 449-454.
29. Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD. Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. *Psychopharmacology [en prensa]*.
30. Correa M, Arizzi, MN, Betz, A, Mingote, S, Salamone, JD. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Psychopharmacology [en prensa]*.
31. Petersen DR, Erwin VG, Deitrich RA. Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. *Res Monographs* 1983; 9: 93-99.
32. Salmela KS, Kaihovaara P, Salaspuro M, Roine RP. Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1011-1015.
33. DeMaster EG, Redfern B, Shirota FN, Nagasawa HT. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 2081-2085.
34. Zimatkin SM, Deitrich RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addict Biol* 1997; 2: 387-399.
35. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain-A review. *Alcohol* 1996; 13: 147-151.
36. Westcott JY, Weiner H, Shultz J, Myers RD. In vivo acetaldehyde in the brain of the rat treated with ethanol. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 411-417.

37. Cohen G, Sinet PM, Heikkilä R. Ethanol oxidation by rat brain *in vivo*. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4: 366-370.
38. Song BJ, Cederbaum AI. Ethanol inducible cytochrome P450 (CYP2E1): Biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 Update. *Alcohol Clin Ex Res* 1996; 20: 138-146.
39. Aragon CMG, Rogan F, Amit Z. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by a catalase-H2O2 system. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 93-98.
40. Gill, K, Menez JF, Lucas D, Deitrich RA. Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 910-915.
41. Lands WEM. A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol* 1998; 15: 147-160.
42. Rout UK. Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. *Alcoholism Clin Exp Res* 1992; 16: 286-289.
43. Upadhyaya S, Tirumalai S, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytocrome P4502E (CYP2E1) in brain: Constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence *in situ* hybridization. *Arch Biochem Biophys* 2000; 373: 23-24.
44. 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.
45. Aragon CMG, Stotland LM, Amit Z. Studies on ethanol-brain catalase interaction: Evidence for central ethanol oxidation. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 165-169.
46. Hamby-Mason R, Chen JJ, Schenker S, Pérez A, Henderson GI. Catalase mediated acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1063-1072.
47. Aragon CMG, Amit Z. Differences in ethanol-induced behaviors in normal and acatalasemic mice: Systematic examination using a biobehavioral approach. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 4: 547-554.
48. Correa M, Miquel M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Effects of chronic lead administration on ethanol-induced locomotor and brain catalase activity. *Alcohol* 1999; 19: 43-49.
49. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. The catalase inhibitor sodium azide reduces ethanol-induced locomotor activity. *Alcohol* 1999; 19: 37-42.
50. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: Is there a functional link? *Psychopharmacol (Berl)* 1999; 144: 83-89.
51. Escarabajal D, Miquel M, Aragon CMG. A psychopharmacological study of the relationship between brain catalase activity and ethanol's induced locomotor activity in mice. *J Studies Alcohol* 2000; 61: 493-497.
52. Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Influence of brain catalase on ethanol-induced loss of righting reflex in mice. *Drug Alcohol Dep* 2001; 65: 9-15.
53. Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 2000; 95: 91-117.
54. Cunningham CL, Noble DC. Conditioned activation induced by ethanol: Role in sensitization and conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43: 307-313.
55. Masur J, Boerngen R. The excitatory component of ethanol in mice: a chronic study. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 13: 777-780.
56. Phillips TJ, Shen EH. Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *Int Rev Neurobiol* 1996; 39: 243-282.
57. Miquel M, Font L, Aragon CMG. Ethanol- or acetaldehyde-induced sensitization?: The role of brain catalase. *Psychopharmacology* [submitted].
58. Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M, Aragon CMG. Daily injections of cyanamide enhance both ethanol-induced locomotion and brain catalase activity. *Behav Pharmacol* 1999; 10: 459-465.
59. Correa M, Miquel M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Acute lead acetated administration potentiates ethanol-induced locomotor activity in mice: The role of brain catalase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 799-805.
60. Correa M, Miquel M, Aragon CMG. Lead acetated potentiates brain catalase activity and enhances ethanol-induced locomotion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 137-142.
61. Correa M, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Brain catalase activity is highly correlated with ethanol-induced locomotor activity in mice. *Physiol Behav* 2001; 64: 641-647.
62. Pastor R, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Ethanol-stimulated behaviour in mice is modulated by brain catalase activity and H₂O₂ rate of production. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 165: 51-59.
63. Moreno S, Mugnaini E, Ceru MP. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of rat. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 1253-1267.
64. Zimatkin SM, Lindros KO. Distribution of catalase in rat brain: Aminergic neurons as possible targets for ethanol effects. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 167-174.
65. Zimatkin SM. Histochemical study of aldehyde dehydrogenase in the rat CNS. *J Neurochem* 1991; 56: 1-11.
66. Zimatkin SM, Deitrich RA. Aldehyde dehydrogenase activities in the brains of rats and mice genetically selected for different sensitivity to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1300-1306.
67. Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Consequences of monosodium glutamate or goldthioglucose arcuate nucleus lesions on ethanol-induced locomotion. *Drug Alcohol Depend* 2002; 6: 189-194.
68. Miquel M, Font L, Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Neonatal administration of monosodium glutamate prevents the development of ethanol-, but not psychostimulant-induced, sensitization: a putative role of the arcuate nucleus. *Eur J Neurosci* 2003 17: 2163-2170.

69. Sanchis-Segura C, Correa M, Aragon CMG. Lesion on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion. *Behav Brain Res* 2000; 114: 57-63.
70. Sanchis-Segura C, Aragon CMG. Brain catalase inhibition blocks ethanol-related decrease of blood luteinizing hormone levels in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 1275-1280.
71. Cicero TJ, Newman KS, Gerrity M, Schmoeker PF, Bell RD. Ethanol inhibits the naloxone-induced release of luteinizing hormone-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *Life Sci* 1982; 31: 1587-1596.

DISCUSIÓN

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: La catalasa es fundamental para todas las monooxigenasas que están implicadas tanto en síntesis como en degradación de monoaminas. ¿Habéis comprobado que los efectos que tenéis no pueden ser efectos secundarios a la manipulación o la dinámica de neurotransmisión de estos transmisores específicos de los efectos reforzadores positivos? Por ejemplo, el etanol libera dopamina en el núcleo *accumbens*, y si estás manipulando tanto la síntesis de dopamina como su degradación, estás alterando esa posible señal. ¿Habéis controlado la posibilidad de que sea el etanol y no el acetaldehído el que libere la dopamina en el núcleo *accumbens*?

M. MIQUEL: No, pero esa reflexión también la hemos hecho, y una de las cuestiones en las que empezaremos a trabajar es si la liberación de dopamina se debe al metabolismo del alcohol y en qué medida o se debe a un efecto indirecto sobre la monoaminoxidasa. Es un trabajo que hasta ahora se escapaba a nuestra posibilidad de laboratorio por la especialización técnica que teníamos, y que vamos a llevar a cabo en colaboración con la gente de Galénica de Valencia.

F. RODRÍGUEZ DE FONSECA: Te lo decía porque también otra manera de comprobarlo es intentar observar si existe algún tipo de relación estructura-actividad. Vosotros no estáis planteando una diana molecular, sino que decís que es una especie muy reactiva. Al ser una especie muy reactiva puede estar tocando muchos frentes que no se controlan. Otra cosa es la dinámica de aparición del acetaldehído *in vivo* o por microdiálisis o en células.

M. MIQUEL: Medir acetaldehído en cerebro es difícilísimo. De hecho, al realizar un homogeneizado de cerebro, salvo que pongas un inhibidor de la aldehído deshidrogenasa, no se detecta, porque el rango es nanomolar y los cromatogramas de gases no miden rangos nanomolares. Por tanto, el problema es de medida, no de que no haya acetaldehído. Pero una línea esperanzadora son unos datos recientes que hay sobre microdiálisis en líquido intersticial de zonas determinadas, como el caudado o el cerebelo. Pa-

rece que se puede detectar acetaldehído tras una dosis de 1 g/kg de alcohol en una rata. En cuanto al mecanismo de acción, sólo sabemos dos cosas: una, que el acetaldehído no se une a receptores ionotrópicos, no se comporta como el alcohol, y dos, que forma macromoléculas con dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, serotonina y también con β -endorfina, y que esas macromoléculas cuando se sintetizan y si se administran al animal producen efectos reforzantes, efectos activadores, etc. Ésos son hoy por hoy los únicos datos de que disponemos.

M. CASAS: Hace unos años se argumentó que los productos de condensación entre el acetaldehído y las aminas biógenas eran las tetrahidroisoquinolinas y el salsolinol, que también has nombrado. El salsolinol podría ser una forma de bajo rendimiento de entrar en la vía de los péptidos opioides. Es decir, traducido a la clínica, el alcohólico no es un alcohólico, sino que es un heroínómano en potencia, lo que pasa es que como la heroína no está en el mercado, pues se tira al alcohol, ya que es un individuo que necesita péptidos opioides, por decirlo así. Estoy seguro de que es una hipótesis que nos gusta mucho a los clínicos, que nos justificaría una realidad, ya que cuando le administras metadona el individuo deja de tomar alcohol y a la que le retiras la metadona vuelve a tomar alcohol. ¿Se podría explicar a través de la catalasa esta hipótesis de que realmente el etanol no actúa como etanol sino que actúa a través del sistema opioide?

M. MIQUEL: Exactamente. Ésa fue una tesis doctoral de uno de los miembros de nuestro laboratorio, Carles Sanchis-Segura. Todos nuestros datos sugieren que puede haber un metabolismo catalasémico del etanol en las zonas periventriculares del hipotálamo produciéndose la liberación de β -endorfinas. Es verdad que los datos de autoadministración de etanol en el área tegmental ventral, o en núcleo *accumbens*, de alguna manera, afectan a esa hipótesis, porque, claro, si el sistema fundamental es el sistema β -endorfinico, ¿por qué los animales se autoadministran acetaldehído o etanol en el

área tegmental ventral? Pero salvo ese escollo, todo encaja. Es muy interesante, puede ser el etanol y el acetaldehído vía β -endorfinas. Por ejemplo, en cortes de cerebro de animales tratados con etanol, la expresión de c-fos y el marcaje mu casi coinciden.

M. CASAS: Perfecto, porque además, lo que os decía antes que la prueba del nueve de los básicos es la clínica y eso encajaría perfectamente con la clínica.

P. ROBLEDO: ¿Habéis hecho o sabéis de alguien que haya hecho lesiones del arqueado, y qué efecto tienen sobre las propiedades reforzantes del alcohol?

M. MIQUEL: No. En estos momentos lo que hay son dos trabajos fuera y uno en fase de publicación que es de sensibilización. El único trabajo previo a los nuestros es de Crabbe y Dorsa (1985) que hicieron una lesión del arqueado también con glutamato monosódico, y midieron el efecto agudo. Cuando existe lesión el efecto estimulante agudo se reduce y la sensibilización se bloquea, pero no se sabe nada más. Nosotros ahora estamos realizando un trabajo que consiste en administrar un inhibidor, ácido sódico, un inhibidor competitivo de la catalasa en arqueado directamente, y medir la conducta en ratas. Y confirmamos lo que hemos observado hasta ahora. Es decir, vemos una prevención del efecto depresor que tiene el alcohol en ratas.

P. ROBLEDO: Otra pregunta que te quería hacer era sobre la distribución de la catalasa. Has hablado del núcleo del tracto solitario y del arqueado. ¿Hay otras estructuras que destaquen por su concentración elevada en catalasa?

M. MIQUEL: Sí, catalasa hay en todos sitios. Lo que pasa es que cuando se hace inmunohistoquímica, lo que se observa es que evidentemente todas las células tienen catalasa, porque si no no pueden sobrevivir, pero existen zonas especialmente densas, lo que tiene sentido, porque son todas las zonas cuya barrera hematoencefálica es débil. Son zonas del cerebro que al no tener barrera hematoencefálica se tienen que defender ante tóxicos de otras maneras, por ejemplo, mediante enzimas antioxidantes; también la superóxido dismutasa está ahí muy coexpresada. Todas las zonas periventriculares, órganos circunventriculares, son zonas de expresión, pero la más alta expresión está en el tracto solitario y en el núcleo arqueado del hipotálamo. El tracto solitario es otra de las estructuras cuyas funciones en los efectos del alcohol están pendientes de estudio.

S. ERILL: ¿Tienes datos sobre penetrabilidad de la D-penicilamina en el sistema nervioso central? ¿Y sobre volatibilidad del acetaldehído?

M. MIQUEL: No. Precisamente estamos buscando un inhibidor del paso de la D-penicilamina a través de la barrera hematoencefálica y todavía no lo hemos podido encontrar. Sería un inhibidor del transporte a través de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica del tior D-penicilamina, porque para otros aminoácidos existe, por ejemplo, para la hipotaurina o para la cisteína está la β -alanina, que bloquea el paso y bloquea, además, el efecto de la hipotaurina en la locomoción inducida por el alcohol. Pero para D-penicilamina no lo hemos encontrado.

S. ERILL: Quizás verapamilo. ¿Y sobre la volatibilidad del acetaldehído?, ya que a lo mejor no se encuentra porque ya se ha ido.

M. MIQUEL: El acetaldehído es volátil, lo que pasa es que yo creo que no se encuentra en el cerebro por tres razones. Una es la proporción en la que se genera, la segunda es porque la aldehído deshidrogenasa es una enzima muy eficaz y la tercera es porque el poco acetaldehído que hay se une inmediatamente y ya no lo puedes medir. O sea la única solución para medir acetaldehído, probablemente la solución de futuro, sea un anticuerpo de la proteína, un anticuerpo para salsolinol o un anticuerpo para TIQ, un anticuerpo que realmente te permita evaluar el acetaldehído unido, porque acetaldehído libre queda poco.

S. ERILL: Te lo digo porque hay muchos componentes volátiles que simplemente durante la conservación del cerebro se pierden, y eso podría dar lugar a una posible forma de análisis sencillísima, que sería la extracción del cerebro inmediatamente después de la administración del alcohol, la colocación en el tubo de ensayo tapado con un tapón de goma, facilitar la evaporación colocándolo a 40 °C y hacer cromatografía en fase de vapor, que es limpiísima.

M. MIQUEL: Eso lo hacemos así cuando medimos alcohol. Normalmente lo hacemos en homogeneizado.

J. PINEDA: Respecto a la D-penicilamina, ¿se sabe de algún otro tipo de actividad que tenga sobre algún otro sistema?

M. MIQUEL: Lo único que sabemos sobre la D-penicilamina es que es un potente quelante de metales. No hay nada más publicado, al menos que yo conozca. Claro, la quelación de metales también habría que plantearse como un mecanismo de interacción con los efectos del alcohol. Por eso la idea es utilizar

también otro tipo de secuestradores. Hay un equipo de investigación, dirigido por Nagasawa, que llevó a cabo los estudios bioquímicos con la D-penicilamina y el secuestro de acetaldehído, y ahora tiene moléculas muchísimo más específicas, porque han descubierto cuál es el grupo que se une realmente al acetaldehído y están sintetizando captadores muy específicos. Nuestra idea es empezar a trabajar con estas moléculas, porque a lo mejor nos evitaríamos la quelación de metales.

E. AMBROSIO: Has dicho que el modelo no funciona en ratas, ¿a qué te refieres con eso?

M. MIQUEL: Me refiero a los efectos estimulantes del alcohol. No es posible inyectar alcohol a una rata y observar estimulación motora. Si tú haces que una rata consuma alcohol, a las concentraciones que ella decida consumir, e inmediatamente y la pones en un *open field*, entonces sí observas estimulación. Evidentemente para la ingesta la rata sí es un buen modelo. Pero el problema son los estudios de estimulación.