

Estado redox cerebral en modelo no clínico de bebedor social

Brain redox status in non-clinical model of social drinker

María Teresa Díaz-Soto^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-4663-0879>

Lena Valdés González¹ <https://orcid.org/0000-0002-6214-1656>

María de los Ángeles Bécquer² <https://orcid.org/0000-0001-9106-9000>

Ambar Oyarzábal Yera³ <https://orcid.org/0000-0003-3014-5457>

Irene Alonso Camaraza⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5409-831X>

José Miguel Calderín-Miranda¹ <https://orcid.org/0000-0002-0310-6949>

¹Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, Cuba.

²Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. La Habana, Cuba.

³Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Centro de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

⁴Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Facultad de Ciencias Médicas de Artemisa. Artemisa, Cuba.

*Autor para la correspondencia: teresads@ifal.uh.cu

RESUMEN

Introducción: El estrés oxidativo es una entidad con marcada participación en el desarrollo de daño neuronal en el caso de las adicciones, fundamentalmente en el alcoholismo. Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos y no clínicos que se reportan exploran las etapas de alcoholismo y abstinencia, por lo cual, los estudios de las etapas iniciales son insuficientes.

Objetivo: Evaluar el estado redox cerebral de ratas Wistar en un modelo de bebedor social.

Métodos: Se determinaron marcadores redox de protección (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido) y daño (malonildialdehído) en un modelo de bebedor social en ratas Wistar.

Resultados: Se observó un desequilibrio redox a nivel cerebral, evidenciado por la variación de las enzimas antioxidantes y los niveles de concentración de malonildialdehído en el grupo consumidor de etanol.

Conclusiones: El desequilibrio redox cerebral observado en ratas Wistar, en un modelo de bebedor social, es representativo de una incipiente peroxidación lipídica que evidencia que en el modelo no clínico de bebedor social existe daño neuronal.

Palabras clave: alcohol; especies reactivas de oxígeno; estrés oxidativo; malonildialdehído.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress is an entity with marked participation in the development of neuronal damage in the case of addictions, mainly in alcoholism. However, most reported clinical and non-clinical studies explore the stages of alcoholism and abstinence, so early-stage studies are insufficient.

Objective: Evaluate the brain redox status of Wistar rats in a social drinker model.

Methods: Redox markers of protection (superoxide dismutase, catalase, reduced glutathione) and damage (malondialdehyde) were determined in a social drinker model in Wistar rats.

Results: A redox imbalance was observed at the brain level, evidenced by the variation of antioxidant enzymes and malondialdehyde's concentration levels in the ethanol consuming group.

Conclusions: The cerebral redox imbalance observed in Wistar rats, in a social drinker model, is representative of an incipient lipid peroxidation that shows that in the non-clinical model of social drinker there is neuronal damage.

Keywords: alcohol; reactive oxygen species; oxidative stress; malondialdehyde.

Recibido: 27/02/2021

Aceptado: 18/05/2021

Introducción

El alcohol es la droga de abuso más extendida en el mundo y la de mayor impacto social dentro de las de consumo legal, por las alteraciones que reporta en la conciencia y en el comportamiento. Existen diversas clasificaciones sobre las formas de consumir bebidas con contenido alcohólico que van desde abstinencia hasta alcohólico, aumentando con cada clasificación la frecuencia, cantidad y dependencia física a la sustancia.^(1,2)

Los efectos directos del etanol sobre diferentes sistemas de neurotransmisión a nivel del sistema nervioso central (SNC) provocan alteraciones conductuales que se prolongan considerablemente si se llega al síndrome de abstinencia alcohólica (SAA). Diversos autores han demostrado el desequilibrio neuronal en los que están presentes estos neurotransmisores, el cual, previo a la adicción, pudiera estar asociado a afectaciones del estado redox a nivel cerebral.^(2,3,4) De ser así, su conocimiento permitiría esclarecer las causas del comportamiento previo a la conducta adictiva.

En todo proceso de adicción las etapas iniciales tienen un carácter decisivo. La comunidad científica y los centros de salud están altamente involucrados en los trabajos de prevención a las adicciones, son muchos los estudios clínicos y no clínicos que han estudiado las etapas de alcoholismo y de abstinencia alcohólica, no obstante, los estudios realizados sobre las etapas iniciales son insuficientes.^(1,4)

Sobre la base de estos antecedentes el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el estado redox cerebral de ratas Wistar en un modelo de bebedor social.

Métodos

Modelo de bebedor social: el desarrollo del modelo de bebedor social se realizó siguiendo la metodología publicada por *Duquesne-Chávez y Díaz-Soto*.⁽¹⁾ Se utilizaron ratas macho de la línea Wistar, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Los animales se mantuvieron en una habitación climatizada ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), expuestos a un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y recibieron agua (grupo control) o solución hidroalcohólica (grupo etanol) y pienso, ambos de forma controlada en las siguientes cantidades, 60 mL y 45 g, respectivamente:

- Grupo control, n = 5 solo consumió agua.
- Grupo etanol, n = 5 fue tratado con soluciones hidroalcohólicas.

Al grupo etanol se le suministró soluciones hidroalcohólicas, en las cuales se les proporcionó el equivalente a 2 tragos por semana en humanos de bebidas a diferentes concentraciones (comportamiento de bebedor social) de la siguiente manera:

- Etanol al 5 %: dos veces a la semana durante 2 semanas
- Etanol al 10 %: dos veces a la semana durante una semana
- Etanol al 15 %: dos veces a la semana durante una semana
- Etanol al 20 %: dos veces a la semana durante 3 semanas

Los animales fueron ubicados en “cajas hogar” (uno por caja) donde se les ofreció la posibilidad de consumir alcohol libremente durante 24 h. Como medida se tomó el volumen consumido de cada botella y la preferencia por el alcohol y se transfirió por la proporción de alcohol consumida en relación con el volumen total de líquido consumido.

Teniendo en cuenta que las afectaciones conductuales que provoca el etanol están asociadas a desequilibrios del estado redox se evaluaron parámetros de daño (MDA) y protección [superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GSH)] lo que permite analizar el estado redox y sus consecuencias en la etapa inicial del consumo de etanol.

Estudio del estado redox celular en el modelo de bebedor social: en una etapa posterior se realizaron determinaciones bioquímicas en el cerebro de los animales objeto de estudio.

Toma y procesamiento de muestras para determinaciones bioquímicas: los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Fueron extraídos los cerebros de los animales y estos fueron almacenados a -20 °C para posteriores estudios.

Preparación de homogenado de cerebro: los homogenados se obtuvieron empleando el homogenizador de cuchillas (Edmund Bühler HO4, Alemania), para lo cual se utilizó 1g de tejido en 10 mL de buffer sacarosa-Tris-HCl pH=7,4 0,2 M, según se describe en el PNO/TEC/0303. Posteriormente, se centrifugó 10 min, 3000 rpm a 4 °C (Sigma Centrifuge 2K15, Reino Unido). El sobrenadante se guardó para la determinación de los marcadores de estrés oxidativo.

Evaluación de marcadores de estrés oxidativo: fueron determinados marcadores de lesión malonildialdehído (MDA) y protección (CAT), SOD, (GSH) en los grupos experimentales.

Determinación de la actividad de catalasa (CAT): la técnica utilizada fue la referida según Boehringer-Mannheim,⁽⁵⁾ y su fundamento consiste en la variación de la densidad óptica (D. O.) ($\lambda=240$ nm) que tiene lugar durante la descomposición del H_2O_2 por la CAT. La actividad enzimática se siguió a $25^\circ C$ y $pH = 7,0$; se reportó en $U.L^{-1}.min^{-1}$.

Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD): la determinación de la actividad de la SOD se realizó por el método descrito por Yi Sun y otros,⁽⁶⁾ que emplea pirogalol, el cual, en medio básico, se autooxida generando en el medio de reacción el radical $O_2^{\cdot-}$. De esta forma, la reacción radicalaria se propaga, acelerando la autooxidación del pirogalol, cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un sequestrador de radicales $O_2^{\cdot-}$ en el medio, como la SOD, inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio, se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50 % la reacción de autooxidación del Pirogallol a $25^\circ C$ y $pH 8,2$. Los resultados se expresaron como $U.L^{-1}.min^{-1}$.

Determinación de glutatión reducido (GSH): la concentración de glutatión reducido (GSH) fue determinada según se describe mediante la utilización del reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) (Sigma) a una concentración de 10 mM.⁽⁷⁾

Determinación de malonildialdehído (MDA): el MDA se midió como indicador de la peroxidación lipídica (POL), utilizando el método colorimétrico que emplea el 1-metil-2-fenilindol, cromógeno reportado por Esterbauer en 1990.⁽⁸⁾

Determinación de proteínas totales: la concentración de proteínas totales en el homogenado de cerebro fue determinada por el método descrito por Bradford (1976).⁽⁹⁾ Este método se basa en la coloración de las proteínas presentes en el medio con el reactivo azul de Coomassie (Sigma), detectable a 595 nm.

Consideraciones éticas

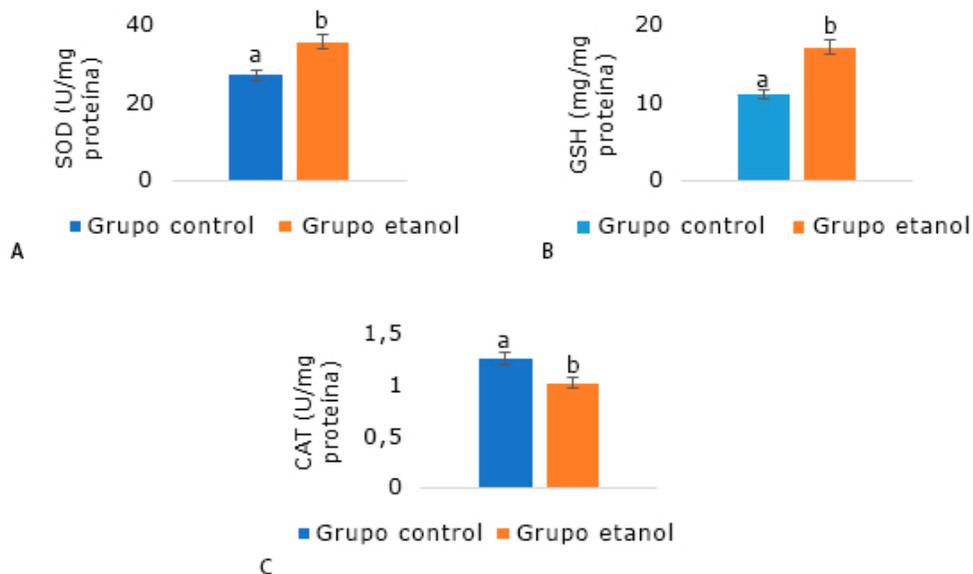
Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con lo establecido en los procedimientos normalizados de operación (PNO) vigentes en el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. La presente investigación fue aprobada por el comité de ética de dicha institución. Los investigadores involucrados en el estudio respetaron los principios éticos que rigen los experimentos con animales, garantizando su bienestar y protección. Se cumplieron las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas.⁽¹⁰⁾

Procesamiento estadístico

Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a un análisis exploratorio donde se detectaron puntos aberrantes (*outliers*). Además, se estimaron parámetros descriptivos como media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre los dos grupos en una variable en cuestión se utilizó la prueba t de Student. El nivel de significación estadístico empleado fue como mínimo de $p < 0,05$. Los datos fueron procesados utilizando en paquete estadístico: STATISTICA versión 6.0 para WINDOWS.

Resultados

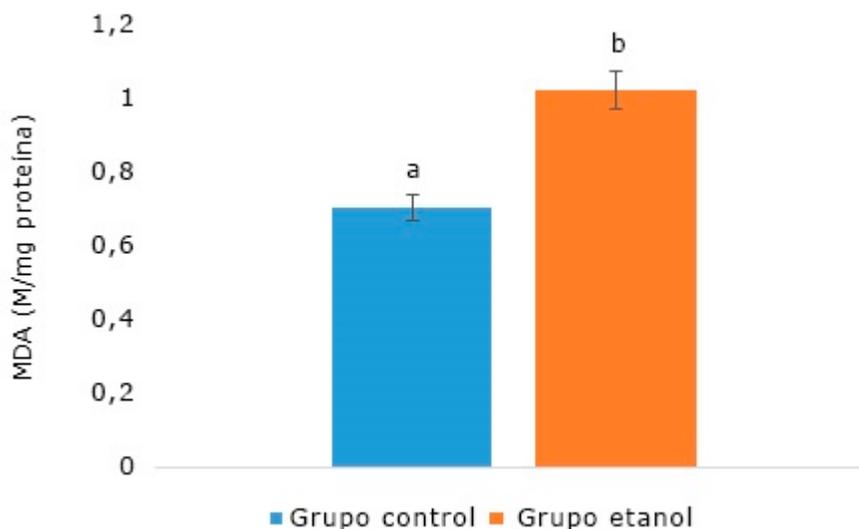
La figura 1 muestra el comportamiento de los marcadores de protección para los dos grupos experimentales. La actividad de la SOD incrementó significativamente para el grupo etanol (35,625 U/mg proteína) en comparación con el grupo control (27,187 U/mg proteína) (Fig. 1A). De igual forma, se observaron diferencias significativas en la concentración de GSH entre ambos grupos, lo que evidenció un aumento en el grupo etanol (17,142 mg/mg proteína) (Fig. 1B). Por otra parte, hubo una disminución significativa de la actividad de la CAT del grupo etanol con respecto al grupo control (1,02 vs. 1,262 U/mg proteína respectivamente) (Fig. 1C).



A) actividad de las enzimas SOD; B) las concentraciones de GSH (indicadores de protección); C) actividad de las enzimas CAT. Se representa la media \pm error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

Fig. 1- Evaluación del estado redox cerebral de ratas en modelo de bebedor social.

Como resultado del metabolismo del etanol se pueden formar aldehídos asociados al daño tisular, por lo que se pudo determinar la concentración de MDA, detectándose un aumento significativo de este metabolito en el grupo que consumió etanol (1,021 M/mg proteína) con respecto al grupo control (0,7018 M/mg proteína) (Fig. 2).



Se representa la concentración de MDA en el homogenado de cerebro de los grupos experimentales: grupo control (agua) y grupo etanol (solución hidroalcohólica). Se representa la media \pm error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos.

Fig. 2 - Evaluación de un marcador de daño neuronal en modelo de bebedor social.

Discusión

Los sistemas antioxidantes en el SNC son de baja potencia en comparación con otros tejidos, lo que hace al cerebro, de manera general, y principalmente a zonas como la corteza, el cerebelo, el hipotálamo, el *striatum* y la médula espinal, particularmente sensibles al daño por especies reactivas de oxígeno (ERO). Cabe destacar que estas regiones rigen las funciones básicas del cerebro, tanto físicas como cognitivas, por lo cual, la producción de ERO se ha demostrado estar muy implicada en numerosas alteraciones del SNC, en las que se incluyen las enfermedades degenerativas.^(1,2)

Los resultados obtenidos sobre la actividad de la SOD indicaron un incremento en el grupo consumidor de etanol, lo cual puede estar asociado a un aumento de la concentración del anión superóxido sustrato de la enzima que a su vez puede ser

consecuencia del consumo inestable de etanol. Esta suposición se corresponde con varios estudios clínicos y no clínicos que han demostrado la participación importante del anión superóxido en los procesos adictivos.^(3,4)

El GSH antioxidante de bajo peso molecular juega un papel importante como cofactor de enzimas que inactivan compuestos tóxicos generados durante el metabolismo del etanol, contribuyendo de esta forma al mantenimiento del equilibrio redox.^(4,11) En el presente estudio se observa un aumento de la concentración de este cofactor en el grupo etanol, lo cual puede estar asociado, fundamentalmente, a dos eventos. Primero, al incremento de la actividad de la SOD, lo cual provoca una mayor concentración de H₂O₂, molécula que funciona como sustrato de la glutatión peroxidasa (GPx), por tanto la actividad de esta enzima resultará estimulada. Segundo, a la actividad disminuida de la CAT en el grupo etanol con respecto al grupo control lo cual provoca una acumulación de esta ERO, generándose el mismo efecto. Estos dos eventos apuntan a que la GPx tiene un papel importante en el metabolismo del H₂O₂.

Si se tiene en cuenta que la CAT constituye un importante marcador antioxidante que participa en el metabolismo del etanol, pudiera decirse que la disminución de esta enzima puede ser un indicador de su acumulación a nivel cerebral. Lo que pudiera conllevar a la activación de otros sistemas metabolizadores como el alcohol deshidrogenasa y la citocromo P450,^(3,11) de ahí que este resultado pueda estar relacionado con lo observado para el MDA en el presente estudio.

El incremento observado en las concentraciones de MDA para el grupo etanol es representativo del daño cerebral por POL. Este aldehído tiene una especial importancia durante el consumo de etanol ya que es un sustrato de aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2). Esta enzima es responsable del metabolismo del acetaldehído (inductor del daño cerebral por consumo de etanol) y otros aldehídos lipídicos producidos por el metabolismo del etanol.⁽³⁾ Por lo tanto, el incremento del MDA sugiere la inhibición de ALDH2 lo que coincide con lo reportado en un estudio previo que refiere la correlación entre las concentraciones de MDA cerebral y la inhibición del ALDH2 cerebral asociado al consumo de etanol.⁽⁴⁾

La etapa inicial del proceso de adicción se caracteriza por un aumento de la liberación de dopamina cuyo metabolismo también está asociado al aumento de MDA, ya que el metabolismo de este neurotransmisor provoca la formación del 3,4 dihidroxifenilacetaldehído (DOPAC) que inhibe la ALDH2 mediante la formación de enlaces covalentes. Lo anterior trae implícito una disminución el metabolismo de aldehídos tóxicos como el acetaldehído y el MDA. Además, el DOPAC en presencia de H₂O₂ facilita la formación de OH⁻, un radical libre que refuerza considerablemente el desequilibrio redox.^(2,3,11)

Estos hallazgos se corresponden con lo obtenido en este estudio, fundamentalmente con la actividad disminuida de la CAT en el grupo etanol. Esta disminución puede ser consecuencia de la presencia del metabolito de la dopamina que es capaz de unirse al H_2O_2 , disminuyendo la disponibilidad de sustrato para la enzima. Esto, añadido a lo observado respecto a la actividad aumentada de la GPx, demostrada por la alta concentración de GSH que se discutió anteriormente, puede estar implicado en el aumento de MDA observado en el grupo etanol.

El desequilibrio redox a nivel cerebral que se evidenció con la variación de las enzimas antioxidantes y los niveles de concentración de MDA en el grupo etanol, representativos de una incipiente POL, demuestran que en el modelo no clínico de bebedor social existe daño neuronal.

Se concluye que el desequilibrio redox cerebral observado en ratas Wistar, en un modelo de bebedor social, es representativo de una incipiente peroxidación lipídica que evidencia que en el modelo no clínico de bebedor social existe daño neuronal.

Referencias bibliográficas

1. Duquesne-Chávez A, Díaz-Soto MT. Evaluaciones Conductuales en un modelo de bebedor social en ratas Wistar. Rev. CENIC, Cienc. biol. 2020 [acceso 10/12/2020];51(3):164-72. Disponible en: <https://revista.cnic.cu/index.php/RevBiol/article/view/455>
2. Jesse S, Bråthen G, Ferrara M, Keindi M, Ben-Menachem E, Tenasescu R, *et al.* Alcohol withdrawal syndrome: mechanisms, manifestations, and management. Acta Neurol Scand. 2017;135;(1):4-16. DOI: [10.1111/ane.12671](https://doi.org/10.1111/ane.12671)
3. Díaz-Soto MT, Calderín-Miranda JM. Síndrome de abstinencia alcohólica: Resultado del estrés oxidativo y desequilibrio neuronal. Estado del arte. Rev Biomed. 2020;31(2):96-107. DOI: [10.32776/revbiomed.v31i2.779](https://doi.org/10.32776/revbiomed.v31i2.779)
4. Díaz-Soto MT, Fraga-Pérez A, Dranguet-Vaillant J, Jerez E, Bécquer M, Casanova M, *et al.* Efectos del ozono médico sobre la Peroxidación Lipídica y la actividad de la Aldehído deshidrogenasa 2 cerebral en ratas alcohólicas en abstinencia. Rev farmacol Chile. 2019 [acceso 14/11/2020];12(12):30-40. Disponible en: <https://www.sofarchi.cl/wp-content/uploads/Revista-de-Farmacologia%CC%81a-de-Chile-2019-V12-N%C2%B02.pdf>
5. Boehringer Mannheim. Biochemica Information. A revised biochemical reference source. Enzymes for routine. 1.^a ed. Berlin: Boehringer Mannheim; 1987: 15-16.

6. Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem. 1988;34(3):497-500. DOI: [10.1093/clinchem/34.3.497](https://doi.org/10.1093/clinchem/34.3.497)
7. Ecobichon DJ. Glutathione despletion and resynthesis in laboratory animals. Drug Chem Toxicol. 1984;7(4):345-55. DOI: [10.3109/01480548408998263](https://doi.org/10.3109/01480548408998263)
8. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990;186:407-21. DOI: [10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h)
9. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;25(1):192-205. DOI: [10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
10. Asociación Médica Mundial. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica. Buenos Aires, Argentina: WMA; 2016 [acceso 09/02/2020]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/politicas-post/declaracionde-la-amm-sobre-el-usode-animales-en-la-investigacionbiomedica/>
11. León-Regal M, Cedeño-Morales R, Rivero-Morey R, Rivero-Morey J, García-Pérez D, Bordón-González L. La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. Medisur. 2018 [acceso 10/01/2021];16(5). Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3798>.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

María Teresa Díaz Soto: conceptualización; curación de datos; metodología; redacción-revisión y edición.

Lena Valdés González: curación de datos; investigación; validación.

María de los Ángeles Becquer: investigación; recursos.

Ambar Oyarzábal Yera: investigación; visualización.

Irene Alonso Camaraza: análisis formal; recursos.

José Miguel Calderín Miranda: redacción-borrador-original; redacción-revisión-edición; investigación.