

ORIGINAL

Daño cerebral por estrés oxidativo y alteraciones en el comportamiento después de la abstinencia alcohólica en ratas Lewis.

Brain damage by oxidative stress and behavior changes after alcoholic abstinency in Lewis rats

Maikel Arteaga Cruz, María Teresa Díaz-Soto, Yamirka Ivonne Ross Gell, Patricia Gavilondo Rodríguez

Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Facultad de Ciencias Médicas "General Calixto García".

Recibido: 29/6/2017

Aprobado: 23/12/2017

Correo electrónico del autor de correspondencia: kathilu@infomed.sld.cu

RESUMEN.

Los mecanismos por los cuales ocurre la toxicidad por el alcohol no son totalmente conocidos. Un criterio de diagnóstico de la dependencia del alcohol es la aparición de síntomas de abstinencia. Durante la abstinencia alcohólica ocurre incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno. Objetivos: Este estudio se propuso determinar la relación entre los marcadores indicadores del daño cerebral inducido por estrés oxidativo y cambios conductuales después de 2 semanas de abstinencia alcohólica en ratas. Método: Ratas Lewis machos(250-300g) se distribuyeron en dos grupos; el Grupo I recibió agua durante el experimento y en el Grupo II se les fue introduciendo gradualmente el consumo de etanol en soluciones de 10, 20, 30, y 40 % (56 días). Se realizó la prueba de tolerancia farmacológica y se determinaron variables bioquímicas relacionadas con el estado redox. Se retiró la administración de etanol de forma abrupta. Después de dos semanas de abstinencia las ratas fueron sujetas a varios ensayos conductuales. Se obtuvo tejido de cerebro y se midieron marcadores de estrés oxidativo. Resultados: Dos semanas después de la abstinencia alcohólica hubo una disminución de la actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa y Catalasa así como de la concentración de Glutatión reducido, indicando una disminución de las defensas antioxidantes en tejido cerebral. Se constató un incremento en las concentraciones de Malonildialdehído y nitritos/nitratos a nivel cerebral. Ocurrieron alteraciones en el grupo II, relacionadas con la memoria y capacidad de aprendizaje, actividad locomotora y

ORIGINAL

ansiedad, correlacionada con las variables redox. Conclusiones: El estrés oxidativo es un inductor del daño cerebral y está relacionado con afectaciones ocurridas después de dos semanas de abstinencia alcohólica, en nuestras condiciones experimentales.

Palabras Claves: Abstinencia alcohólica, estrés oxidativo, cambios conductuales.

SUMMARY.

One diagnostic criterion of alcohol dependence is the appearance of a withdrawal syndrome when alcohol consumption ceases. Ethanol withdrawal (EW) increases reactive oxygen species formation. The mechanisms by which oxidative stress contributes to alcohol toxicity are still not fully understood. Purpose. This study aimed at investigating the relationship between measures of brain damage induced by oxidative stress and behaviour changes after two weeks of EW in rats. Method. Male Lewis rats (250-300 g) were used. Two groups: (I) Control, received tap water for the entire duration of the experiment; and (II) Ethanol (ET-OH), rats were gradually introduced to ethanol consumption through ET-OH solutions from 10, 20, 30 and 40% (56 days). Blood ethanol determination and pharmacologic tolerance were evaluated. Afterwards, ethanol administration was abruptly ceased. After two weeks of EW, rats were subjected to behaviour tests (Morris Water Maze, Rotarod and Elevated Plus Maze) followed by brain tissue collection to measure markers of oxidative damage. Results. Two weeks after EW, a significant increase in brain oxidative stress was found. This was characterized by a decrease in the activity of superoxide dismutase and catalase as well as in the GSH content, indicating an impairment of the antioxidant defences. Brain levels of malonildialdehyde and nitrites/nitrates (a measure of nitric oxide formation) were significantly increased. Behavioural alterations in memory/learning, locomotor activity and anxiety correlated with the redox variables. Conclusions. Oxidative stress is an inductor of brain injury and it is associated with behavioural impairments after two weeks of EW, in our experimental conditions. Antioxidant therapy with pleiotropic effects seems to be promissory in EW treatment.

Keys Words: Ethanol withdrawal, oxidative stress, behaviour changes.

INTRODUCCIÓN.

El abuso del consumo de etanol está definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el causante del 3,2% de muertes anualmente, la reducción de doce años de la expectativa de vida y de cuatro del total de años de vida productiva por muerte prematura.¹Un criterio diagnóstico de la dependencia al alcohol es la aparición del síndrome de Abstinencia Alcohólica (AA), cuando cesa el consumo de etanol.

ORIGINAL

En numerosos resultados de estudios experimentales se ha demostrado que las consecuencias de este síndrome encontradas en animales coinciden con las observadas en humanos. En dichos estudios se han observado alteraciones de la postura corporal, anomalías motoras, de hiperactividad, convulsiones, ansiedad, entre otros signos clínicos.^{2, 3}

La ingestión crónica de altas concentraciones de alcohol puede causar estrés oxidativo como resultado de la formación de un exceso de especies oxidantes, acetaldehído, oxidación de lípidos y de proteínas y de sus productos altamente reactivos.⁴ Aductos derivados del metabolismo del etanol han sido encontrados en las áreas del cerebro que presentan alteraciones estructurales y funcionales en consumidores crónicos de etanol.⁵ En el cerebro, la mitocondria aparece como la principal diana del estrés oxidativo, afectado por intoxicación y AA.⁶

Durante la AA ocurre excesiva transmisión Glutamatérgica, lo que aumenta las concentraciones de calcio intracelular y las especies reactivas de oxígeno como el radical anión Superóxido.⁷ Sin embargo, los mecanismos por los que el estrés oxidativo contribuye a la toxicidad por el alcohol aún no han sido completamente dilucidados. Teniendo en cuenta los antecedentes referidos el propósito de este estudio es determinar la relación entre los marcadores indicadores de estrés oxidativo y cambios conductuales después de dos semanas de abstinencia alcohólica en ratas.

MÉTODOS.

Se utilizaron ratas Lewis macho (250-300g) provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque, Cuba). Las ratas fueron alimentadas con pienso (45 g) y agua o etanol *adlibitum*, en cajas hogar, bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Las ratas fueron divididas en dos grupos (10 ratas/grupo). Los grupos fueron (I) Control, que recibió agua durante todo el experimento y (II) Etanol (ET-OH). A este grupo gradualmente se le introdujo el consumo de etanol en soluciones desde 10, 20, 30, y 40%, durante 56 días dos semanas con cada solución. Sesenta mililitros de agua o soluciones de etanol fueron colocados en cada caja diariamente durante 8 semanas. En una etapa posterior (semana 9) se realizó la prueba de tolerancia farmacológica que consistió en exponer las ratas del grupo II al consumo libre de agua, etanol o ambos. La presencia o no de tolerancia farmacológica fue evaluada mediante la medición de los volúmenes consumidos de agua o etanol durante 24 horas.

Las ratas alcohólicas fueron sometidas a seleccionar la solución de alcohol entre 10 y 40% durante dos semanas (evaluar la adicción). Durante este tiempo fue medido el volumen de etanol

ORIGINAL

consumido. Posteriormente la administración de etanol cesó abruptamente. Después de dos semanas de abstinencia se evaluó la actividad conductual y se obtuvo tejido de cerebro para realizar las determinaciones relacionadas con el estrés oxidativo.

Determinación de etanol en sangre.

La sangre (200 μ l) fue extraída del plexo ocular e inmediatamente mezclada con 90 μ l de HClO_4 0,55M. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 10 minutos para sedimentar las proteínas precipitadas. El sobrenadante fue ajustado a pH 5 con 200 μ l de una solución que contenía KOH 0,6 M y ácido acético 50 M (PNT/TEC/0301 del CEIEB), los cuales fueron centrifugados para sedimentar el KClO_4 . El etanol contenido en el sobrenadante fue medido por técnica colorimétrica.⁹

Evaluación de los signos de abstinencia alcohólica.

Fueron seleccionados tres test conductuales de acuerdo a la correspondencia entre los signos de abstinencia alcohólica en humanos y animales: Laberinto Acuático de Morris (LAM), Rotarod y Laberinto Elevado en Cruz.³ El LAM estándar que se utilizó es una prueba de aprendizaje espacial que sirve para aumentar y resaltar la estrecha correlación con la función de los receptores N-Malonildialdehído

(NMDA) involucrados en la conducta de refuerzo y retorno durante la AA.^{10, 11}

Antes de comenzar el experimento, los animales (grupos Control y ET-OH) fueron entrenados durante 5 días con 2 sesiones por día. Los animales fueron guiados durante 60 segundos para encontrar la plataforma sumergida.¹⁰

La descripción de la actividad locomotora mimetizó la agitación psicomotora en humanos durante la abstinencia alcohólica.³ Esta fue evaluada utilizando la prueba del Rotarod. Las afectaciones motoras en este estudio fueron evaluadas con el uso de la velocidad acelerada del Rotarod (Ugo Basile, Varese, Italy, Model 7750). Las ratas fueron primero habituadas a la rueda estacionaria y después fueron expuestas a la rueda rotando. La rueda fue acelerando la velocidad desde 2 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ linealmente a 20 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ en 300 s y fue determinada la latencia sobre el Rotarod.

Los animales fueron entrenados para estar sobre la rueda acelerada por un mínimo de 30 s. Si ellos no cumplían con este criterio, el experimento era repetido por un máximo de 5 veces. Los dos mejores resultados de valores de latencia de cada rata fueron archivados y usados para el análisis de datos, las ratas que no fallaron durante los 5 min (300 s) fueron tomadas como un máximo de 300 s.¹²

ORIGINAL

La ansiedad es otro signo de abstinencia alcohólica en humanos. Este signo puede ser evaluado en ratas a través de la exploración de espacios abiertos. Fue usado el Laberinto Elevado en Cruz de MED Associates, Inc., St.Albans, VT. Los animales fueron transportados a una habitación inmediatamente continua a la habitación donde se realizaría el ensayo y fueron entrenados para estar habituados aproximadamente 30 minutos antes de comenzar el ensayo. Las ratas fueron colocadas en el laberinto por 5 minutos y recogido el número de veces de entradas en los brazos cerrados y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto.¹³ El comportamiento conductual de los grupos experimentales fue recogido por dos observadores.

Determinación de estrés oxidativo en homogenizado de cerebro.

Al finalizar la etapa de abstinencia alcohólica las ratas fueron sacrificadas por anestesia con dietiléter. El cerebro fue removido para el estudio del estrés oxidativo. El homogenizado de cerebro se obtuvo usando el homogeneizador Edmund Bühler a 4°C. Los homogenizados fueron preparados usando un buffer de KCl/histidina 50 mM, pH 7.4, y fueron centrifugados con una Centrifuga Sigma, a 4°C y 8 500 g por 20 min. En los sobrenadantes se determinaron indicadores de estrés oxidativo (SOD, CAT y MDA). Fue utilizado Espectrofotómetro Ultrospect Plus procedente de Pharmacia LKB para la realización de las determinaciones antes mencionadas según las técnicas utilizadas.

Para la determinación de malonildialdehído (MDA) se utilizó un juego de reactivos comerciales LPO-586, Calbiochem (La Jolla, CA, USA). En el ensayo la producción de un cromóforo estable se midió a 586nm.¹⁴ La cuantificación de hidroperóxidos totales se realizó mediante Bioxytech-H₂O₂ usando Xilenol naranja para formar un complejo coloreado estable, el cual fue medido a 560 nm. Las concentraciones de nitrito/nitrato fueron determinadas según la reacción de Griess, por la conversión de nitrito a nitrato usando la nitrato reductasa (Boehringer Mannheim, ItalySpA, Milan, Italy). La absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de microplacas Ultrospect Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB (Pittsburgh, PA, USA). La actividad superoxidodismutasa (SOD) fue medida usando un juego de reactivos comerciales (Cat. No. SD125 and No. RS505, Randox Ltd., Ireland). La actividad catalasa (CAT) se determinó mediante un método cinético basado en la descomposición de peróxido de hidrógeno a 240 nm.¹⁶ Después de la precipitación de grupos thioles de las proteínas con ácido tricloroacético al 10%, el glutatión reducido (GSH) se determinó de acuerdo al método de Sedlak and Lindsay¹⁷ y la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford.¹⁸

ORIGINAL

Análisis estadístico: Se aplicó análisis de varianza (ANOVA modo simple) seguido por la prueba de homogeneidad de varianza (Bartlett-Box) y una prueba de comparación (T de Student). Para el estudio de correlación entre los ensayos conductuales y las variables redox se utilizó el coeficiente de Pearson. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar en 10 animales. Los niveles de grupo significación estadística fueron reportados para $p < 0,05$.

RESULTADOS.

Tolerancia farmacológica.

En las ratas convertidas en alcohólicas fue medida la tolerancia farmacológica (Figura 1A). Las ratas alcohólicas prefirieron la solución de mayor concentración de etanol (40%), el volumen consumido fue mayor, en comparación con la solución al 10% ($p < 0,05$). Al final de la abstinencia alcohólica (2 semanas) el grupo que consumió etanol incrementó el consumo de agua con respecto al grupo control (Figura 1B).

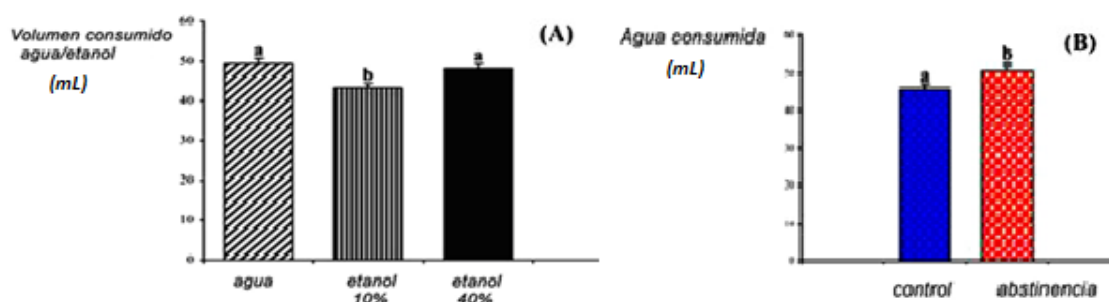


Figura 1. Consumo de etanol al 10% y 40% durante la prueba de tolerancia farmacológica.

Signos conductuales al final de la abstinencia alcohólica.

Después de 2 semanas de AA las ratas tratadas con etanol mostraron afectación de la memoria espacial (Figura 2A). Ellas demoraron más tiempo para encontrar la plataforma (9 min más que el grupo control). Al final de la AA, las ratas alcohólicas mostraron afectación motora. Ellas disminuyeron el tiempo de permanencia sobre la rueda y sólo pudieron permanecer 60 s (Figura 2A). La conducta ansiogénica durante la AA, medida en el Laberinto Elevado en Cruz se presenta en la Figura 2B. La AA redujo el número de entradas a los brazos cerrados (en 5 min) y aumentó el tiempo que las ratas permanecían en los brazos abiertos por 29,6% y 67,7% respectivamente en comparación con el grupo control.

ORIGINAL

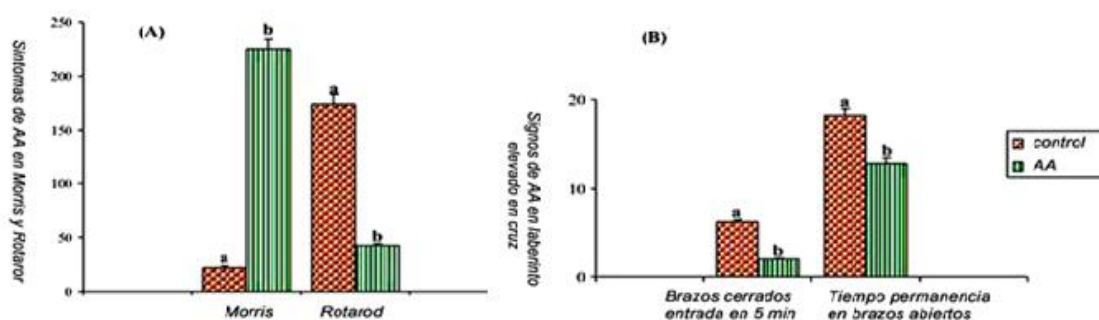


Figura 2. Signos conductuales al final de la abstinencia alcohólica.

Balance antioxidante-pro-oxidante en homogenizado de cerebro.

Los marcadores redox en homogenizado de cerebro se muestran en la Tabla 1. Al final de la AA existió un incremento del estrés oxidativo en comparación con el control. Los indicadores de defensa antioxidante (SOD, CAT y GSH) disminuyeron mientras que el MDA y las concentraciones de nitrito/nitrato (un marcador de la generación de óxido nítrico, se incrementaron ($p < 0,05$). Los hidroperóxidos totales disminuyeron después de las 2 semanas de AA.

Tabla 1. Marcadores redox en homogenizado de cerebro al final de la Abstinencia Alcohólica.

Marcadores redox	Control(Agua)	AA
MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	$3,22 \pm 0,23$	$3,87 \pm 0,13b$
HT ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	$64,31 \pm 2,9$	$29,30 \pm 4,7b$
NO_2/NO_3 (nmol/mg proteína)	$46,30 \pm 11$	$56,11 \pm 4,8b$
SOD (U/mg/proteína)	$65,82 \pm 48$	$56,10 \pm 4,8b$
CAT (U/mg proteína)	252 ± 66	$37,23 \pm 4,2b$
GSH (mg/mg proteína)	$131,6 \pm 12a$	$94,8 \pm 23b$

AA: Abstinencia Alcohólica, MDA: malonildialdehido, HT: hidroperóxidos totales, NO_2/NO_3 :nitritos/nitratos; SOD: actividad superóxidodismutasa, CAT: actividad de catalasa; GSH: glutatión reducido. Cada valor es la media \pm desviación estándar. b: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos control y AA

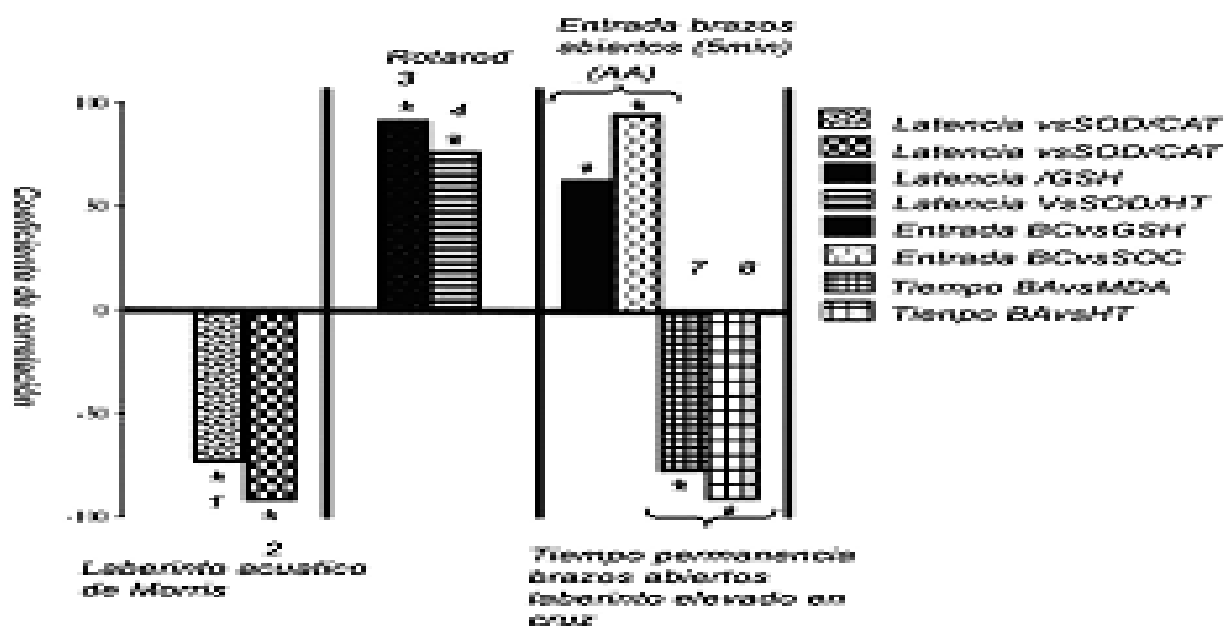
ORIGINAL

Fuente: Tejido de cerebro de rata analizado en el laboratorio de Bioquímica del Centro Nacional de Control Biológico.

Correlaciones entre variables del comportamiento conductual en la AA y marcadores del estrés oxidativo.

El análisis reveló una correlación positiva entre los resultados del rotarod y los marcadores relacionados con SOD/HT ($p < 0,05$) así como la entrada a los brazos cerrados (en 5 min) con el GSH ($p < 0,05$) y la relación SOD/GSH ($p < 0,05$), la capacidad de aprendizaje y memoria mostró correlaciones negativas con GSH ($p < 0,05$) y la relación SOD/CAT ($p < 0,05$), la ansiedad (tiempo de permanencia en los brazos abiertos) correlacionó negativamente con dos marcadores del daño oxidativo MDA y HT ($p < 0,05$) (Figura 3).

Figura 3 Correlación entre los signos conductuales en la AA y el daño oxidativo en el cerebro.



DISCUSIÓN.

El consumo excesivo de etanol por un prolongado período de tiempo provocó dependencia alcohólica y se logró un estado neurofisiológico de adaptación que provocó signos y síntomas (semejantes al síndrome de abstinencia alcohólica) cuando el consumo de etanol se redujo drásticamente o se detuvo completamente.

El consumo voluntario así como las concentraciones de alcohol en sangre fueron similares a los reportados para ratas que tienen mayor preferencia por etanol, resultado comparable con los

ORIGINAL

reportados por [Buck](#) y colaboradores en 2012, al realizar un estudio con modelos de animales que presentaban una variedad genética que provoca afectaciones en el fenotipo con importantes efectos en la severidad de la abstinencia alcohólica, en la respiración mitocondrial y generación de especies reactivas del oxígeno (ERO).²⁸

Las ratas alcohólicas prefirieron la solución de alcohol al 40%. El volumen total consumido al 40% no fue diferente al consumido de agua por el grupo control. Estos resultados sugieren que las ratas pertenecientes al grupo II adquirieron tolerancia farmacológica (Figura 3A). Al final de la AA las ratas consumieron un volumen mayor de agua en comparación con el grupo control. Estos resultados pudieran ser consecuencia de la ansiedad por consumir alcohol, el cual fue retirado dos semanas antes.¹⁹

Solamente algunos reportes de daño cerebral por estrés oxidativo después de la Abstinencia Alcohólica han sido desarrollados. Recientemente se ha realizado un estudio determinando la susceptibilidad del daño que puede provocar el aumento de pro-oxidantes en el sistema nervioso central de ratas, comprobándose mayor susceptibilidad en ratas macho debido al efecto protector en el sexo femenino de 17 β -estradiol.²⁵

El MDA y los hidroperóxidos totales (HT) son marcadores del daño celular oxidativo. Un incremento en las concentraciones de MDA es representativo del daño cerebral por per-oxidación lipídica. Este aldehído (tóxico similar al acetaldehído que se acumula durante la AA) es de relevancia en el alcoholismo y en la AA ya que el MDA es un sustrato de la aldehído deshidrogenasa (ALD2). Esta enzima es responsable del metabolismo del acetaldehído (inductor del daño cerebral por consumo crónico de etanol) y de otros aldehídos lipídicos producidos por el metabolismo del etanol.²²

Algunos autores han reportado un incremento de radicales superóxido en tres regiones del sistema nervioso central en ratas en AA.⁷ [Ramamourty y](#) colaboradores verificaron la presencia de altas concentraciones de MDA, consecuencia de la per-oxidación lipídica, durante la Abstinencia Alcohólica.

Los HT disminuyeron al final de la AA, hallazgo que puede estar en relación con la posibilidad de derivarse a la formación de otras ERO y sugiere la existencia de otras vías conectadas con la producción de las ERO.²⁰

Una disminución de los sistemas antioxidantes endógenos se observó después de las dos semanas de Abstinencia Alcohólica. La disminución de la actividad SOD y CAT puede responder

ORIGINAL

a menor disponibilidad de las enzimas antioxidantes dadas las posibles modificaciones oxidativas de las proteínas enzimáticas, causadas por radicales libres generadas durante el metabolismo del etanol a acetaldehído. Ramamourty y colaboradores, sin embargo, observaron elevada actividad SOD y disminuida actividad CAT en AA con respecto a un grupo control.²⁶

Se observó además una disminución del GSH, antioxidante de bajo peso molecular que desempeña un papel importante como cofactor de enzimas que inactivan compuestos tóxicos generados durante el metabolismo del etanol. A pesar que este resultado no se corresponde con el obtenido por Hydzik P y colaboradores en pacientes en abstinencia alcohólica, se ratifica que el consumo crónico de etanol puede aumentar la formación de especies reactivas del oxígeno y disminución de los mecanismos de defensa antioxidante mitocondrial.²⁷

La depleción del GSH provoca la acumulación de sustancias tóxicas y promueven el daño cerebral. Las concentraciones de nitrato/nitrito aumentaron en las ratas en AA comparado con el grupo control. La disminución de SOD y el incremento de nitrito/nitrato sugieren la generación de peroxinitrito, una citotoxina bien conocida, resultados que coinciden con lo planteado por el grupo de Yuksel N²⁴ y por Tamara R en 2009, quien reconoce que el estrés oxidativo resultado de la disfunción mitocondrial, ex citotoxicidad, o neuro-inflamación está presente en numerosas condiciones degenerativas.²⁹

La generación de un flujo moderado de per-oxinitrito por largos períodos de tiempo resultará en una oxidación sustancial y destrucción potencial de importantes constituyentes celulares, provocando la disfunción de procesos celulares críticos, disrupción de vías de señalización y la inducción de muerte celular a través de apoptosis y necrosis.²⁰ Estos eventos patológicos están presentes en mecanismos de ex citotoxicidad asociados al daño cerebral que ocurren durante la AA.

Después de 2 semanas de AA las ratas mostraron afectación de las funciones cerebrales como la capacidad de aprendizaje y memoria, actividad locomotora y ansiedad.

Debido al estrés oxidativo inducido en el cerebro de las ratas se investigó la relación entre los marcadores redox y las pruebas conductuales realizadas. Los resultados sugieren que la actividad locomotora y la memoria de las ratas después de 2 semanas de AA se afectaron por las concentraciones de GSH y dadas las correlaciones SOD/CAT, SOD/HT y SOD/GSH.

Se encontraron correlaciones negativas memoria/aprendizaje. El incremento de los marcadores antioxidantes disminuyen la latencia para encontrar la plataforma sumergida, mientras que la

ORIGINAL

actividad locomotora (rotarod) y la hipoactividad (entrada a los brazos cerrados en 5 min) mostraron una correlación positiva, lo que indica que el incremento de las relaciones SOD/HT ($p < 0.0001$), SOD/CAT, SOD/GSH ($p < 0.0001$) y GSH pueden favorecer la actividad locomotora en la AA.

La ansiedad es otro síntoma de la AA. Los marcadores de daño oxidativo el MDA e HT mostraron correlaciones negativas con el tiempo de permanencia en los brazos abiertos lo que sugiere que la per-oxidación lipídica y otros procesos oxidativos promueven el daño cerebral asociado con comportamiento ansioso en la AA. La SOD estuvo correlacionada en un 50% con otros marcadores redox lo cual sugiere el papel del radical superóxido y la importancia de la actividad de la SOD en el daño oxidativo cerebral y en el comportamiento en la AA, en nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, la mayoría de las correlaciones que fueron encontradas entre los marcadores redox sugiere el papel de estas interacciones en el daño cerebral después de dos semanas de AA.

Consideraciones finales.

El estrés oxidativo se relaciona con el daño cerebral y afectaciones del comportamiento después de dos semanas de AA, en las condiciones experimentales descritas. Las correlaciones entre variables demostró el papel de las ERO en los signos de AA asociados con aprendizaje/memoria, actividad locomotora y comportamiento ansioso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Rehm J, Monteiro M. Alcohol consumption and burden of disease in the Americas: Implications for alcohol policy. *Rev Panam Salud Pub.* 2005; 18: 241-8.
2. Tabakov B, Hoffman PL. Animal models in alcohol research. *Alcohol ResHealth.* 2000; 24: 77-84.
3. Becker HC. Animal models of alcohol withdrawal. *Alcohol Res Health.* 2000; 24: 105-13.
4. Amanvermez R, Agara E. Does ascorbate/L-Cys/L-Met mixture protect different parts of the rat brain against chronic alcohol toxicity? *AdvTher.* 2006; 23: 705-18.
5. Forn C, Sanchis S. The possible role of acetaldehyde in the brain damage caused by the chronic consumption of alcohol. *Rev Neurol.* 2003; 37: 485-93.
6. Jung ME, Yan LJ, Forster MJ, Simpkins JW. Ethanol withdrawal provokes mitochondrial injury in an estrogen preventable manner. *J Bioenergy Biomembr.* 2008; 40:35-44.
7. Jung M, Simpkins J, Wilson A, Mallet R. Intermittent hypoxia conditioning prevents

ORIGINAL

8. behavioural deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats. *J Appl Physiol.* 2008; 105: 510-7.
9. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *ProcNutrSoc.* 2006; 65: 278-90.
10. Smolen A, Marks MJ, Smolen TN, Collins AC. Dose and route of administration alter the relative elimination of ethanol by long-sleep and short-sleep mice. *Alcohol ClinExpRes.* 1986; 10: 198-204.
11. Vorhees Ch V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protocol.* 2006; 2:848-58.
12. Justin T. Gass M, Olive F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75:218-65.
13. Callaway JK, Lawrence AJ, Jarrott B. AM-36, a novel neuroprotective agent, profoundly reduces reactive oxygen species formation and dopamine release in the striatum of conscious rats after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion. *Neuropharmacol.* 2003; 44:787-800.
14. Knappa DJ, Overstreet DH, Moya SS, Breese GR. SB242084, flumazenil, and CRA1000 block ethanol withdrawal-induced anxiety in rats. *Alcohol.* 2004; 32:101-11.
15. Ester Bauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-21.
16. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. *Methods Enzymol.* 1995; 7: 78-83.
17. Boehringer Mannheim. A revised biochemical reference source. *Enzymes for routine*, 1st edition. Biochemical information. Boehringer Mannheim, Berlin, Germany, 1987: 15-6.
18. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
20. Gilpin NW, Badia-Elder NE, Elder RL, Stewart RB. Schedule-induced Polydipsia in lines of rats selectively bred for high and low ethanol preference. *Behav Genet.* 2008; 38: 515-24.
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology Rev.* 2007; 87: 315-424.
22. Kwan-Hoon M, Bong-Jo K, Byoung JS. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *FEBS Lett.* 2005; 579:6115-9.

ORIGINAL

24. Sun AY. Ethanol and oxidative stress. *Alcoholism: clinical and experimental research* vol. 25, No. 5 May supplement 2001.
25. Yuksel N, Vzbay IT, Karakilic H, Aki OE, Etik C, Erbas D. Increased serum nitrite/nitrate (NOx) and malonildialdehyde (MDA) levels during alcohol withdrawal in alcoholic patients. *Pharmacopsychiatry*. 2005; 38: 95-160.
26. Jung ME, Metzger DB. A sex difference in oxidative stress and behavioral suppression induced by ethanol withdrawal in rats. *Behav Brain Res*. 2016; 314: 199-214. doi : 10.1016/j.bbr.2016.07.054.
27. Parthasarathy R, Kattimani S, Sridhar MG. Oxidative stress during alcohol withdrawal and its relationship with withdrawal Indian severity .*J Psychol Med*. 2015; 37(2):175-80. doi: 10.4103/0253-7176.155617.
28. Hydzik P, Krośniak M, Francik R, Gomółka E, Ebru ED, Zagrodzki. Serum antioxidant parameters in patients poisoned by different xenobiotics. *Acta Pol Pharm*. 2016; 73(2):337-44.
29. Buck KJ, Milner LC, Denmark DL, Grant SG, Kozell LB. Discovering genes involved in alcohol dependence and other alcohol responses: role of animal models. *Alcohol Res*. 2012; 34(3):367-74
30. Golden TR, Patel M. Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(3)

ORIGINAL

Contenido

Daño cerebral por estrés oxidativo y alteraciones en el comportamiento después de la abstinencia alcohólica en ratas Lewis. 133

Brain damage by oxidative stress and behavior changes after alcoholic abstinency in Lewis rats
Maikel Arteaga Cruz María, Teresa Díaz-Soto, Yamirka Ivonnie Ross Gell, Patricia Gavilondo
Rodríguez 133

RESUMEN. 133

SUMMARY. 134

INTRODUCCIÓN. 134

MÉTODOS. 135

RESULTADOS. 138

DISCUSIÓN. 140

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. 143