



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“EFECTO DEL ACETALDEHÍDO EN LOS
CAMBIOS CONDUCTUALES Y
NEUROQUÍMICOS INDUCIDOS POR MK-801 EN
RATAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

MÓNICA PADILLA DE LA TORRE

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS PAZ TRES

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAC y T) por
otorgar la Beca de Maestría No. 182506

A los Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Carlos Paz Tres

Dr. Abel Santamaría del Ángel

Dra. Milagros Méndez Ubach

Dedicatorias:

A mis papás que son los más extraordinarios del mundo, que siempre me han apoyado, ayudado y alentado a luchar por conseguir lo que quiero.

Al M. en C. Javier Franco Pérez, por todo el apoyo académico, el cariño y la importantísima contención emocional que me brindó durante estos últimos maravillosos ocho años.

A esas amigas entrañables, las que siempre han estado a mi lado, dando color y alegría a mi vida: Mónica Adriana, Ireri, Jimena, Sara, Verónica y Edith.

A mi hermosísima y amada Gala.

Principalmente dedico esta tesis a mi hermosa y querida Low, que habría estado contenta y feliz de verme en esta nueva etapa de la vida. Gracias por tu valentía, cariño entrañable, enseñanzas y tu valiosísima existencia en mi vida. ¡Te extraño siempre!

A mi amiguita Alejandra, que aunque pasen los años te recuerdo siempre con amor y agradezco a la vida haber conocido alguien tan especial como tú. Gracias por todo lo que me diste y enseñaste.

Agradecimientos:

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, que me formó y a la que tanto le debo. Ha sido un orgullo y un honor ocupar un lugar entre las filas de tan maravillosa institución.

A mi tutor Dr. Carlos Paz Tres, con quien ya he recorrido un largo camino.

A los miembros del jurado: **Dra. Teresa Fortoul, Dr. Carlos Paz, Dr. Manuel Miranda, Dr. Abel Santamaría, Dra. Milagros Méndez.** Muchas gracias por sus importantes observaciones académicas y colaboración para la elaboración de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y al departamento de Neurofisiología.

A mis compañeros de laboratorio Ma. Carmen Rubio, Francisco Gutiérrez, por todo su apoyo y ayuda técnica durante las diferentes etapas de este proyecto.

A todas mis ratitas, que sin saberlo tuvieron la desgracia de participar en la realización de este trabajo.

A mi profesor Erazo que de una forma u otra me ayudó a poder alcanzar mis metas académicas en el mundo de la biología.

Índice:

I. Resumen.....	1
II. Abstract.....	3
III. Antecedentes.....	4
i. Control del movimiento.....	4
a) Generalidades sobre locomoción.....	4
b) Participación de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico en el control del movimiento.....	8
ii. Efectos del MK-801 sobre el receptor NMDA, la dopamina y la locomoción.....	10
iii. Etanol.....	13
a) Alcoholismo.....	13
b) El etanol y sus efectos generales sobre el SNC.....	17
c) Efectos del etanol sobre los sistemas glutamatérgico, dopaminérgico y la locomoción	20
iv. Acetaldehído.....	21
a) Generalidades sobre acetaldehído.....	21
b) Efectos del acetaldehído en el SNC.....	24
IV. Hipótesis.....	31
V. Objetivos.....	32
VI. Material y métodos.....	33
a) Animales.....	33
b) Diseño experimental.....	33
c) Diagrama.....	35

d) Estudio conductual.....	35
e) Estudio neuroquímico.....	37
f) Análisis estadístico.....	38
VII. Resultados.....	39
a) Actividad motora.....	39
b) Contenido de dopamina.....	42
VIII Discusión.....	46
IX Conclusiones.....	51
X. Referencias bibliográficas.....	52
XI. Apéndice.....	67
a) Carta de aceptación para publicación	68
b) Artículo enviado (en prensa).....	69

III. Abreviaturas:

Acetil CoA.....	Acetil-coenzima A
ACH.....	Acetaldehído
ADH.....	Alcohol-deshidrogenasa
ALDH.....	Aldehído-deshidrogenasa
AMPA.....	L- α -amino-3-hidroxi-5 metilsasol-4 propianato
AVT.....	Área ventral tegmental
ANOVA.....	Análisis de varianza
ASAM.....	American Society of Addiction and Medicine
CE.....	Cuerpo Estriado
D1.....	Receptores a dopamina tipo 1
D2.....	Receptores a dopamina tipo 2
DA.....	Dopamina
DOPAC.....	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DSM-IV-TR.....	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.
EEG.....	Electroencefalograma
Gaba.....	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor a Gabaérgico tipo A

GGT.....	Gammaglutamiltranspeptidasa
Glu.....	Glutamato
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
HVA.....	Ácido homovanílico
Ip.....	Intraperitoneal
LTP.....	Potenciación a largo plazo
MAO.....	Monoamina-oxidasa
MK-801.....	5R, 10S-(+)-5-metil-10, 11- dihidro- 5H-dibenzo [a,d] cicloheptén-5, 10-imina ó dizolcipina
NAc.....	Núcleo accumbens
NAD.....	Nicotín adenín dinucleótido
NMDA.....	N-metil-D-aspartato
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
SAA.....	Síndrome de abstinencia
SAL.....	Salsolinol
SN.....	Sustancia nigra
SNc.....	Sustancia nigra compacta
SNc.....	Sustancia nigra pars compacta
SNC.....	Sistema Nervioso Central
SNP.....	Sistema Nervioso Periférico

I. Resumen:

Se ha reportado que la administración sistémica del MK-801 (antagonista no competitivo del receptor a NMDA) en ratas, provoca incrementos significativos sobre el patrón de locomoción, así como un aumento en la liberación de dopamina en algunas regiones cerebrales como núcleo accumbens, área ventral tegmental y cuerpo estriado.

Por otro lado, en las últimas décadas muchos de los efectos neurotóxicos producidos por la ingestión de etanol han sido atribuidos al acetaldehído, que es el principal metabolito producido después de la ingestión de etanol. Actualmente, se conoce poco sobre la forma específica en que el acetaldehído actúa sobre el sistema nervioso central, sin embargo, se ha demostrado que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y permanecer en el cerebro de la rata hasta 120hrs después de una inyección intraperitoneal. Además, se ha sugerido que el acetaldehído ejerce algún tipo de control sobre la transmisión dopaminérgica a través de la formación de otros compuestos con la dopamina, los cuales eventualmente podrían modificar el contenido de dopamina y su metabolismo. Con la finalidad de evaluar el efecto del acetaldehído, el MK-801 y la co-administración de ambos fármacos, sobre el patrón de locomoción y el metabolismo de dopamina, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar separadas en cuatro diferentes grupos experimentales: 1) Control (salina 1ml ip.); 2) MK-801 (0.3mg/kg ip.); 3) ACH (200 mg/kg ip.); 4) MK-801 más ACH (donde el

MK-801 se administró 20 minutos antes que el ACH). El patrón de locomoción fue evaluado con un aparato de campo abierto, después de 30 minutos de habituación y se cuantificaron el número de movimientos horizontales, y ambulatorios o estereotípias durante 1 hora cada 5 minutos. El ensayo neuroquímico se realizó con cromatografía de líquidos de alta resolución, en dos regiones del cerebro de la rata: cuerpo estriado y corteza frontal. Los resultados mostraron que el grupo tratado con MK-801 presentó un incremento significativo en el patrón de locomoción. En contraste, no se observaron diferencias significativas en las pruebas de locomoción después de la administración de acetaldehído. Sin embargo, el grupo administrado con ambos fármacos mostró una disminución significativa en la locomoción, comparada con el grupo de solo MK-801. Por otro lado, el análisis neuroquímico mostró un incremento en el contenido de dopamina en el cuerpo estriado y la corteza frontal después de la administración de MK-801, aunque el incremento se revirtió con 200 mg/kg de acetaldehído. En conclusión, estos resultados nos indican que el acetaldehído provoca un efecto antagónico sobre las alteraciones en el patrón de locomoción y los cambios en el contenido de dopamina inducidos por MK-801, probablemente interfiriendo con el metabolismo de la dopamina.

II. Abstract:

Alterations in motor activity related to dopamine changes in some brain regions have been described as consequences of those modifications produced by systemic administration of MK-801 (a non-competitive NMDA receptor antagonist) in rats. Acetaldehyde, the main metabolite of ethanol, has been implicated in different alterations in the Central Nervous System after ethanol ingestion. Acetaldehyde might exert some control on dopaminergic transmission through the formation of other compounds with dopamine, which eventually may modify dopamine content and its metabolism. In order to evaluate such hypothesis, in the present study we used Wistar rats to evaluate the effect of acetaldehyde on locomotor alterations and dopamine metabolism changes induced by MK-801. Our results show that MK-801-treated group had a significant increase in the locomotor activity. In contrast, we did not find significant differences in locomotion test after acetaldehyde administration. However, the group administered with both drugs showed a significant decrease in locomotor activity compared with MK-801 alone. The neurochemical analysis showed an increase in dopamine content in the striatum and frontal cortex after MK-801 administration though; the increase was reverted by 200 mg/kg of acetaldehyde. In conclusion, these results indicate that ACH can be producing an antagonic-like effect on locomotor alterations and dopamine content changes induced by MK-801, thus modulating the MK-801-induced hyperlocomotion by interfering with dopamine metabolism.

III. Antecedentes

i. Control del movimiento

a) Generalidades sobre locomoción

Una de las características esenciales de la vida animal es la capacidad para el desplazamiento de un sitio a otro. En términos muy generales, el objetivo de moverse, es obtener los recursos necesarios o evitar situaciones adversas. La forma de locomoción de un animal está determinada de acuerdo a las características físicas y biológicas del medio ambiente que lo rodea, del tamaño, la arquitectura o morfología, así como su historia filogenética (Osenkop y Kavaliers, 1996). Aunque se han desarrollado muchas formas diferentes de locomoción, como la natación, el desplazamiento a gatas, el vuelo y la ambulación, una característica común a todas ellas es la generación de movimientos rítmicos y alternativos en el cuerpo y los miembros. Su carácter rítmico hace que la locomoción parezca una acción estereotipada constituida por repeticiones de los mismos movimientos. En efecto, esta característica repetitiva permite que la locomoción sea controlada de manera automática en el sistema nervioso sin intervención de centros superiores. No obstante, la locomoción suele tener lugar en ambientes impredecibles. Por lo tanto, el movimiento de locomoción debe ser modificado de manera continua, habitualmente de forma sutil, para adaptar el patrón de movimiento estereotipado al ambiente inmediato (Pearson y Gordon, 2000)

Dentro de los factores biológicos, que competen a los roedores, como las ratas de la cepa Wistar utilizadas en este trabajo, existen algunos que deben ser

tomados en consideración cuando van a realizarse experimentos de locomoción (Tabla 1). Esto se debe principalmente a que todos ellos pueden hacer una gran diferencia en los resultados, y es fundamental determinar que las variables en todos los individuos sean minimizadas, de tal modo que no interfieran en la interpretación de los datos que se obtienen experimentalmente.

Tabla 1. Factores biológicos que afectan la actividad locomotora

- ⊗ Especie o cepas
- ⊗ Diferencias individuales
- ⊗ Edad
- ⊗ Sexo
- ⊗ Estado reproductivo
- ⊗ Estado alimenticio y presencia de alimento
- ⊗ Estado de salud e inmunidad
- ⊗ Presencia de ecto y endoparásitos
- ⊗ Ritmos circadianos
- ⊗ Ritmos anuales y estacionales

Tomado de Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996.

La metodología y las variables de procedimiento son muy importantes cuando se habla de mediciones de actividad locomotora (Tabla 2). La mayoría de esos factores están relacionados con la biología del animal en estudio y todos ellos pueden afectar la actividad motora (Tabla 1). Asimismo, las manipulaciones y pre-tratamientos utilizados en el laboratorio también parecen tener un gran impacto sobre los niveles de actividad locomotora. El estrés y la ansiedad asociados con el confinamiento, incluyendo las cámaras donde viven, el contacto humano y la limpieza, pueden limitar o modificar sustancialmente la actividad (como por ejemplo, la inducción de estereotipias). Estos efectos conductuales,

quizá en parte, estén relacionados con el tipo de casas (cámaras donde viven) y variaciones en diversos factores: (i) El ambiente físico como temperatura, humedad relativa, calidad e intercambio de aire y agua, ruido y vibraciones, entrada de estímulos olfatorios, incluidas feromonas, etc. (ii) El ambiente social, incluye presencia o ausencia de individuos del mismo sexo o del opuesto, densidad de población, condiciones reproductivas y de desarrollo. (iii) El ambiente nutricional, incluyendo modificaciones de dieta, disponibilidad de alimento y horarios de alimentación (Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996)

Tabla 2. Factores metodológicos y de procedimientos que afectan la actividad locomotora.

- ⊗ Manipulación y pre-tratamientos
- ⊗ Niveles de estrés y ansiedad
- ⊗ Características de las cámaras donde viven
- ⊗ Manipulación previa
- ⊗ Aclimatación
- ⊗ Experiencia anterior con los aparatos de experimentación
- ⊗ Condiciones ambientales durante la medición de actividad
- ⊗ Ingesta y horarios de agua y alimento
- ⊗ Ritmos endógenos

Tomado de Kavaliers y Perrot-Sinal, 1996.

La medición de la actividad motriz es fundamental para obtener información cuantitativa y cualitativa sobre la conducta general del animal. Los cambios en la locomoción tienen consecuencias sobre la medición de otros aspectos importantes de la conducta, desde la conducta espontánea o patrones conductuales específicos, hasta conductas aprendidas o condicionadas. La importancia de medir la actividad motora, teóricamente se basa en la suposición

de que la actividad espontánea representa un estado de excitación o “un nivel de excitabilidad no específico” en el animal (Ossenkopp y Kavaliers, 1996).

La medición de la actividad locomotora es de importancia para muchas áreas dentro de la investigación en conducta animal básica así como en la investigación biomédica humana.

En este trabajo de investigación se utilizó un aparato que específicamente mide la locomoción y se conoce como prueba de campo abierto. Esta es una de las pruebas más ampliamente utilizadas en el análisis de la conducta animal. El aparato de campo abierto consiste en un espacio amplio abierto que está limitado por cuatro paredes altas, las cuales impiden la huida de los animales (en este aparato normalmente se utilizan roedores). Normalmente el animal es colocado en el aparato por un tiempo determinado, durante el cual, se pueden hacer mediciones directamente por un observador si el equipo no es automatizado. En este diseño experimental, se utilizó un aparato de campo abierto automatizado. Este tipo de mejoras en los instrumentos, fueron diseñados con el afán de eliminar los problemas asociados con la observación directa del investigador, y es capaz de simplificar el procesamiento de datos y su análisis. La mayoría de estos instrumentos utilizan rayos con luz infrarroja, y las interrupciones que se hacen sobre el haz de luz cuando el animal se mueve, son procesadas y cuantificadas con exactitud. Algunos de estos instrumentos tienen los haces de luz dispuestos en varias zonas del campo abierto, lo que permite obtener diferentes tipos de movimiento, por ejemplo, movimientos horizontales, verticales y ambulatorios o estereotipados. Estos métodos automatizados son

capaces de medir un mayor número de variables y además eliminan la influencia o predisposición del observador de la situación experimental, reduciendo los errores sistemáticos que cometen los observadores. También incrementa la adquisición y el análisis de los datos haciéndolo más fácil y rápido el proceso.

b) Participación de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico en el control del movimiento

Las conductas adaptativas, tanto aprendidas como espontáneas, consisten en secuencias de micro movimientos ejecutados por un grupo de músculos cercanos y relacionados (Moore y Grace, 2002). Hay evidencia de que la iniciación y ejecución de movimientos individuales, tales como los movimientos orales involucrados en la alimentación, así como todos los movimientos relacionados en esa secuencia conductual, dependen de redes neuronales que se encuentran dentro del cuerpo estriado (CE) (Matsumoto y cols., 1999). La iniciación y secuenciación motriz está modulada de manera importante por la transmisión dopaminérgica en el CE, lo cual es evidenciado por las alteraciones que se producen con la denervación dopaminérgica sobre la iniciación y secuenciación del movimiento. Sin embargo, los efectos antagónicos sobre los receptores D1 pueden afectar la secuenciación *per se* (se expresan movimientos individuales pero no secuenciales). Consistente con esto, la estimulación de los receptores D1 promueve la consumación de secuencias conductuales tales como el acicalamiento (Molloy y Waddington, 1984). Por otro lado, el bloqueo de los

receptores D2 altera la iniciación de movimientos, mientras que su estimulación provoca repeticiones de conductas simples como olfateos y masticaciones.

Los circuitos fronto-estriatales corresponden a una de las vías del cerebro más importantes relacionadas con el control de la locomoción, la impulsividad, la atención y la emoción. Uno de los ejes de este circuito son las proyecciones dopaminérgicas dentro de las áreas estriatales y mesolímbicas (Carlsson y Carlsson, 1990). La neurotransmisión dopaminérgica ha sido estudiada en relación al movimiento debido a que con las alteraciones en el tono dopaminérgico se evidencian claras alteraciones sobre la locomoción.

Además de la inervación dopaminérgica de la sustancia negra (SN) y el área ventral tegmental (AVT), los ganglios basales reciben entradas glutamatérgicas predominantemente de la corteza prefrontal, así como del hipocampo, tálamo y amígdala (Carlsson y Carlsson, 1990).

Actualmente, se cree que los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico interactúan íntimamente en las neuronas espinales medias de los ganglios basales para el control de la conducta. Particularmente se piensa que hay una interacción en la señalización y regulación entre los receptores dopaminérgicos D1 y/o D2 y el receptor ionotrópico a glutamato NMDA y AMPA (Carlsson, 2001).

Para que la locomoción se lleve a cabo, se requiere de acciones coordinadas entre estructuras corticales y subcorticales (Mink y Thach, 1993). Los ganglios basales, que incluyen (CE), globo pálido, núcleo subtalámico y (SN), juegan un papel muy importante en la modulación de las últimas salidas corticales de neuronas motoras. La sustancia nigra compacta (SNc) es la fuente principal de

entradas ascendentes dopaminérgicas al CE dorsal. Las neuronas GABAérgicas estriatales expresan receptores a dopamina D1 y D2.

ii. Efectos del MK-801 sobre el receptor NMDA, la DA y la locomoción.

Hoy en día se sabe que el sistema glutamatérgico tiene un papel muy importante en algunos desórdenes neurológicos. Los receptores de glutamato pueden ser divididos en dos amplias categorías: los receptores ionotrópicos, que activan directamente los canales iónicos, y los metabotrópicos, que lo hacen de forma indirecta a través de segundos mensajeros. De los receptores ionotrópicos nos enfocaremos en este trabajo específicamente en el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

El receptor NMDA tiene tres propiedades excepcionales. En primer lugar, el receptor controla una canal de cationes de alta conductancia (50 pS) que es permeable a Ca^{2+} , así como a Na^+ y a K^+ . En segundo lugar, la apertura del canal requiere glicina extracelular como cofactor; el canal sólo funciona en presencia de glicina. En condiciones normales, la concentración de glicina en el líquido extracelular es suficiente como para permitir que el canal del receptor NMDA funcione de manera eficaz. En tercer lugar, este canal es el único cuya apertura depende tanto del voltaje de membrana como de un transmisor químico (Kandel y Siegelbaum, 2000).

En los canales activados por NMDA, una partícula bloqueadora extrínseca, el Mg^{2+} extracelular, se une a un sitio del poro del canal abierto y actúa como un

tapón, bloqueando el flujo de corriente. Durante el potencial de membrana en reposo (-65mV), el Mg^{2+} se mantiene unido fuertemente al canal. Pero cuando la membrana es despolarizada, el Mg^{2+} es expulsado del canal por repulsión electrostática, lo que permite la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . Por ello sólo fluye una corriente máxima a través del canal del tipo NMDA cuando se dan dos condiciones: hay glutamato presente y la célula está despolarizada. El receptor NMDA tiene también la interesante propiedad de que es inhibido por un fármaco alucinógeno, la fenciclidina ó PCP (conocido como polvo de ángel) y por el MK-801, que se unen a un sitio dentro del poro del canal abierto distinto al del enlace del Mg^{2+} . El bloqueo de los receptores NMDA produce síntomas que recuerdan las alucinaciones asociadas con la esquizofrenia, mientras que algunos fármacos antipsicóticos aumentan el flujo de corriente a través de los receptores NMDA. Esto ha llevado a la hipótesis de que la esquizofrenia podría implicar un defecto de la función del receptor NMDA (Kandel y Siegelbaum, 2000) y un mal funcionamiento en general de la vía glutamatérgica corticoestriatal asociada a este receptor (Grace, 1991). Asimismo, se ha reportado que con la administración de agonistas al receptor NMDA se producen efectos ansiolíticos, atáxicos y anticonvulsivos (Koek y cols., 1988). El receptor NMDA parece también jugar un papel importante en la modulación de los procesos de aprendizaje y la conducta motriz. Se ha comprobado que la administración sistémica de antagonistas del receptor NMDA induce alteraciones en el aprendizaje espacial (Morris y cols., 1986), en la consolidación

de la memoria (Mele y cols., 1996) y cambios sobre el patrón de locomoción (Al-Katib y cols., 2001).

Por otro lado, con ayuda de los modelos farmacológicos con agonistas y antagonistas del receptor NMDA se ha demostrado que éstos están involucrados en la modulación de una gran variedad de respuestas conductuales. Uno de los antagonistas más utilizados para los estudios de locomoción ha sido la (5R, 10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cicloheptén-5, 10-imina, también conocida como dizocilpina o MK-801 que tiene un peso molecular de 337.37g y una fórmula molecular de $C_{16}H_{15}N-C_4H_4O_4$. Este compuesto fue uno de los primeros antagonistas no competitivos del receptor NMDA descritos que se pudieron usar *in vivo*. Como otros antagonistas no-competitivos (eg. la ketamina), tiene un mecanismo de acción bloqueador dentro del canal iónico, evitando la entrada de Ca^{2+} y Na^+ , lo cual impide la activación del receptor.

Ha sido ampliamente reportado que la administración de MK-801, induce hiperlocomoción, conducta estereotipada y ataxia en roedores (Liljequist y cols., 1991; Dai y cols., 1995; Andiné y cols., 1999; Al-Katib y cols., 2001; Cook y cols., 2004). Asimismo, la administración *in situ* de MK-801 en NAc y CE ventral, ha demostrado provocar también incrementos en la actividad locomotora de ratas (Maldonado-Irizarry y Kelley, 1994).

Por otro lado y de manera muy interesante se ha reportado que la hipercinecia inducida por el MK-801 puede eliminarse o atenuarse de manera importante con la disminución de la DA endógena después de la administración sistémica de

antagonistas para el receptor de DA₁ (Lapin y Rogawski, 1995), o administración de DA directamente en el núcleo accumbens (Nac) (Willins y cols., 1993; Shridhar y cols., 1996). Estos hallazgos sugieren que los principales efectos conductuales del MK-801 son dependientes de la DA. Además, se ha demostrado que el MK-801 produce tanto un incremento en el metabolismo de la DA como en su contenido en regiones cerebrales específicas (Dai y cols., 1995; Al-Khatib y cols., 2001; Svensson y cols., 1991). De igual manera, existen algunos estudios que han reportado incrementos en la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del AVT (Zhang y cols., 1992; Murase y cols., 1993). Debido a esto, se ha supuesto que el MK-801 tiene un papel activo sobre la DA, particularmente en algunas estructuras mesolímbicas (Shridhar y cols. 1996; Qíng-Shan, 1997).

iii. Etanol

a) Alcoholismo

El alcoholismo ha sido históricamente un problema de salud pública en todo el mundo. El abuso de esta droga socialmente consumida, admitida y legalizada puede provocar adicción física y psicológica, siendo una de las principales causas de accidentes automovilísticos, violencia, desintegración familiar, abandono de trabajo, daños en la salud y muerte, en aquellos países donde su consumo es alto. Se puede decir con ésto, que el alcoholismo representa uno de los principales problemas sociales, económicos y de salud pública en todo el mundo (Diamond y Gordon, 1997; Brailowsky y García, 1999).

En términos estrictos el **abuso del alcohol** solamente se diagnostica cuando se ha establecido la ausencia de la dependencia física. La actividad escolar y el rendimiento laboral pueden verse afectados por los efectos de la bebida o de la intoxicación. El sujeto puede beber en situaciones peligrosas (conducir, manejo de máquinas intoxicado). Estos pacientes pueden continuar bebiendo a pesar de que saben los problemas sociales o interpersonales que ello les acarrea (violencia, abuso de familia, etc) (Schuckit y cols. 2004).

Las observaciones en el hombre, han permitido clasificar los estadios del alcoholismo en varias fases (Contreras y cols. 1988):

- ⊗ **Fase pre-alcohólica** sintomática: el individuo bebe para librarse de tensiones, pero acaba por hacerlo diario y requiere cada vez de mayores dosis (tolerancia), para lograr su objetivo.
- ⊗ **Fase crucial:** Se deteriora la personalidad, cambia constantemente de actividad y empieza a beber desde la mañana. Esta fase puede estar relacionada con la superación de la capacidad del organismo para metabolizar el etanol.
- ⊗ **Fase crónica:** aparecen manifestaciones de alteraciones fisiológicas y neurológicas crónicas.

La característica esencial del abuso de sustancias consiste en un patrón desadaptativo en el consumo de éstas, manifestado por consecuencias adversas y recurrentes relacionadas con el consumo repetido de sustancias. Para que pueda aplicarse un criterio de abuso, el problema relacionado con la sustancia debe haberse producido repetidamente durante un período continuado de 12

meses o bien debe ser persistente. La **dependencia fisiológica del alcohol**, en la cual se presentan todos los síntomas del abuso pero con mayores repercusiones, es claramente identificada debido a la aparición de fenómenos como la tolerancia y el síndrome abstinencia (Schuckit y cols. 2004).

La **abstinencia alcohólica** se caracteriza por la aparición de síntomas que se presentan después de 4 a 12 horas de haber disminuido significativamente la ingesta de alcohol tras un consumo prolongado. Debido a que la abstinencia de alcohol puede ser intensa, los sujetos con dependencia pueden continuar consumiendo alcohol, a pesar de las consecuencias adversas, para evitar o aliviar los síntomas de abstinencia. Algunos síntomas de abstinencia pueden persistir durante meses, a intensidades menores como por ejemplo, las alteraciones en el patrón sueño-vigilia. Una vez presente el patrón de uso compulsivo del alcohol, los sujetos con dependencia pueden dedicar mucho tiempo al consumo de bebidas alcohólicas y con frecuencia este alto consumo continúa a pesar de la demostración de las consecuencias adversas físicas o psicológicas como depresión, pérdida de memoria, enfermedades hepáticas u otras secuelas (Schuckit y cols. 2004).

La abstinencia alcohólica se caracteriza por la presencia de un síndrome característico que se desarrolla después de interrumpir o reducir el uso prolongado de grandes cantidades de alcohol. El **síndrome de abstinencia** incluye dos o más de los siguientes síntomas: hiperactividad autonómica (sudoración o pulsaciones por encima de 100); aumento del temblor distal de las manos; insomnio; náusea o vómito; alucinaciones visuales, táctiles o auditivas

transitorias; agitación psicomotora; ansiedad y crisis (Bruijnzeel y cols. 2004). La abstinencia puede provocar un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad laboral, social y de otras áreas importantes de la actividad del sujeto. Los síntomas se alivian con frecuencia tras la administración de alcohol u otros depresores del sistema nervioso central, y éstos se presentan cuando las concentraciones de alcohol en la sangre disminuyen bruscamente (entre 4 y 12 horas) de haber interrumpido o reducido la bebida. Debido a la vida media corta del alcohol, los síntomas de abstinencia alcanzan su mayor intensidad durante el segundo día de abstinencia y mejoran de forma marcada al cuarto o quinto día. Sin embargo, a los síntomas de abstinencia pueden seguir síntomas de ansiedad, insomnio y disfunción autonómica en distintos grados de intensidad durante periodos de 3 a 6 meses (Bruijnzeel y cols. 2004).

La ingestión repetida de dosis altas de alcohol puede afectar casi todos los órganos, especialmente, el sistema digestivo, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). Los efectos gastrointestinales incluyen gastritis y úlceras de estómago o duodeno y cerca del 15% de los grandes consumidores de alcohol presentan cirrosis hepática y pancreatitis. También se ha observado un aumento de la proporción de cáncer de esófago, estómago y otras partes del tubo digestivo.

La neuropatía periférica, que también puede ser provocada por alcoholismo, se identifica por debilidad muscular, parestesias y disminución de la sensibilidad periférica. Dentro de los efectos más persistentes del sistema nervioso central se incluyen déficit cognoscitivo, deterioro grave de la memoria y cambios

degenerativos en el cerebelo. El efecto más devastador sobre el sistema nervioso central es el trastorno amnésico persistente. Este trastorno, también llamado síndrome de Korsakoff, se presenta en alcohólicos de muchos años y es su principal característica es el grave deterioro de la capacidad para procesar nuevos datos en la memoria.

b) Etanol y sus efectos sobre el SNC

El etanol provoca diversos efectos sobre el SNC. Sin embargo, una de las principales dificultades para su estudio es el hecho de que la adicción al alcohol puede tener diferentes efectos de un individuo a otro; entre un sistema de neurotransmisión y otro así como un efecto sobre una región del cerebro u otra. Por esta razón no existe un modelo ideal para el estudio de la adicción al alcohol etanol (Brailowsky y García, 1999).

El alcohol es una droga socialmente permitida que deprime los mecanismos inhibitorios del SNC y tiene un efecto dosis-dependiente. En el hombre y otros animales, la cantidad de drogas encontradas en sangre está relacionado directamente con diversos cambios físicos y psicológicos (Brailowsky, 1995).

El primer sitio de acción del etanol es a nivel membranar; por lo tanto, existen alteraciones en su configuración lo cual provoca a su vez cambios en los receptores y otros eventos que se llevan a cabo en la membrana celular. Todos esos cambios en las propiedades físicas de la membrana quizá sean mecanismos adaptativos por la presencia del alcohol en el SNC (Basalingappa y Sahebarao, 1993)

En ratas, algunos de los fenómenos conductuales modificados después del consumo de etanol son las propiedades de reforzamiento positivo, la conducta de acicalamiento, reflejos, actividades motora y exploratoria, emociones, agresividad y habilidades de aprendizaje condicionadas. Igualmente, cada uno de estos factores puede estar influenciado por estrés, ritmos biológicos, la concentración o el grado del alcohol, las vías de administración, las diferencias entre los individuos (peso, tamaño, especies), factores genéticos, características prenatales, entre otras, que pueden proveer una gran variedad de respuestas (Pallares y cols., 1991).

El etanol altera la mayoría de los sistemas de neurotransmisión y neuromodulación. Su acción puede provocar desde aumentar o disminuir las concentraciones de neurotransmisores debido a cambios en biosíntesis, degradación, transportación, hasta la desensibilización o activación de sus diversos receptores (Nevo y Hamon, 1995; Diamond y Gordon, 1997). En la mayoría de los casos, las monoaminas y opioides son moduladores relacionados en las modificaciones conductuales provocadas por el etanol; la activación catecolaminérgica está involucrada en los efectos estimulantes, mientras que los efectos depresores, abstinencia del alcohol y dependencia física están asociados con procesos GABAérgicos. Los efectos neurotóxicos están relacionados con el sistema glutamatérgico, mientras que los problemas de memoria y algunos de locomoción se atribuyen a los sistemas colinérgico y glutamatérgico (Nevo y Hamon, 1996, Diamond y Gordon 1996; Tabakof y Hoffson 1996).

Se ha reportado que los efectos agudos del etanol sobre la membrana neuronal son diferentes a los que ocurren durante la ingestión crónica (Bassalingappa, 1993; Tabakoff, 1996). El etanol en altas dosis y a corto plazo presenta un perfil farmacológico y conductual muy similar al de las benzodiazepinas y barbitúricos, provocando una serie de efectos característicos como: anestesia, sedación, hipnosis y anticonvulsión (Bannister y cols., 1986; Sudak y cols., 1986; Charness y cols., 1989; Samson y Harris, 1992).

Mucha de la evidencia existente sugiere que el etanol aumenta la función de algunas sinápsis neuronales excitatorias lo cual, aparentemente se debe a la depresión en el control de los mecanismos inhibitorios del cerebro. En los últimos años la atención se ha focalizado sobre los neurotransmisores que fundamentalmente provocan dichas actividades neuronales: GABA (sistema inhibitorio) y glutamato (sistema excitatorio) (Hobbs y cols., 1996). Sin embargo, los efectos sobre dichos sistemas dependen de los tiempos de administración o ingestión. Un ejemplo que apoya esta teoría, se ha realizado en ratas con alta (HAS) y baja sensibilidad al etanol (LAS). En estos experimentos se ha observado que además de presentar diferencias conductuales, también difieren en sus respuestas neuroquímicas al etanol. Los niveles de glutamato disminuyen significativamente en las ratas HAS después de la administración de etanol, mientras que en las ratas LAS el etanol provoca un aumento retrasado de los niveles de glutamato, en comparación con su grupo control. Estos cambios apoyan la teoría de los aminoácidos excitadores, particularmente el glutamato, que toma parte en la determinación genética de la

sensibilidad al etanol y apoya la hipótesis de que el etanol ejerce sus efectos en parte por la alteración de la neurotransmisión glutamatérgica (Dahchour y cols., 2000)

Ha sido demostrado que el etanol a corto plazo es capaz de suprimir los efectos excitatorios del glutamato, inhibiendo el flujo iónico de Ca^{2+} en los receptores NMDA (Lovinger y cols., 1989) y desde luego, se refleja en la disminución de la actividad excitatoria glutamatérgica (Hobbs y cols., 1996).

c) Efectos del etanol sobre los sistemas glutamatérgico, dopaminérgico y sobre la locomoción.

Los modelos animales han sido unas herramientas muy importantes para el estudio sobre los mecanismos de acción del etanol (Deitrich, 1993). Hoy en día, con el desarrollo de nuevas técnicas celulares y moleculares es posible la identificación de funciones celulares tan específicas como el flujo iónico, concentraciones de neurotransmisores, identificación y cuantificación de receptores, con las cuales se han analizado los efectos que provocan el etanol y otras drogas a un nivel más específico.

El etanol, a través de sus acciones sobre el sistema nervioso central, se sabe que provoca una gran variedad de efectos conductuales en roedores.

La respuesta clásica de administración sistémica aguda de etanol de dosis altas es una depresión dosis-dependiente en la actividad motora. En ratones, el etanol muestra un efecto bifásico sobre la locomoción, mostrando efectos estimuladores o depresivos sedantes dependiendo de la dosis (con dosis bajas y altas

respectivamente) y el tiempo después de la administración. (Little, 2000). Por ejemplo, la administración ip de dosis bajas de etanol ha mostrado incrementos significativos sobre la locomoción en ratones (Correa y cols., 2001). De manera inversa, cuando el etanol es administrado a dosis altas, se induce una supresión en la locomoción e incoordinación motora (Crabbe y cols., 1982).

IV. Acetaldehído

a) Generalidades sobre acetaldehído

El acetaldehído (ACH), es una molécula altamente reactiva, tiene un olor irritante y es soluble en agua y etanol. Es utilizado en la industria para la manufactura de paraldehído, ácido acético y perfumes. En seres humanos, existen concentraciones mínimas de ACH endógeno, muy por debajo de las que se alcanzan en hígado, sangre y cerebro después de la ingestión de etanol y se ha determinado que es mucho más tóxico que el etanol con una dosis letal media (DL_{50}) de 1930 mg/kg por vía oral en ratas (Smyth y cols, 1951).

El ACH es el primer metabolito del etanol. Es un compuesto biológicamente muy activo y recientemente se ha especulado que juega un papel muy importante en los efectos tóxicos provocados por la administración de etanol. Aunque muchos órganos muestran propiedades enzimáticas para la degradación del etanol, la mayor parte de éste (más del 90%) se metaboliza en el hígado y del 2-10% es eliminado por pulmones y riñones (Lieber, 1997).

El primer paso en el metabolismo enzimático del etanol está mediado por la enzima citosólica alcohol-deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión de etanol

a ACH y está acoplada con la reducción de nicotín- adenosín-dinucleótido ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$). El siguiente paso del metabolismo está mediado principalmente por la acción de la aldehído-deshidrogenasa. Esta enzima rápidamente convierte el ACH a acetato. La aldehído-deshidrogenasa también usa NAD^+ como cofactor en la oxidación del ACH.

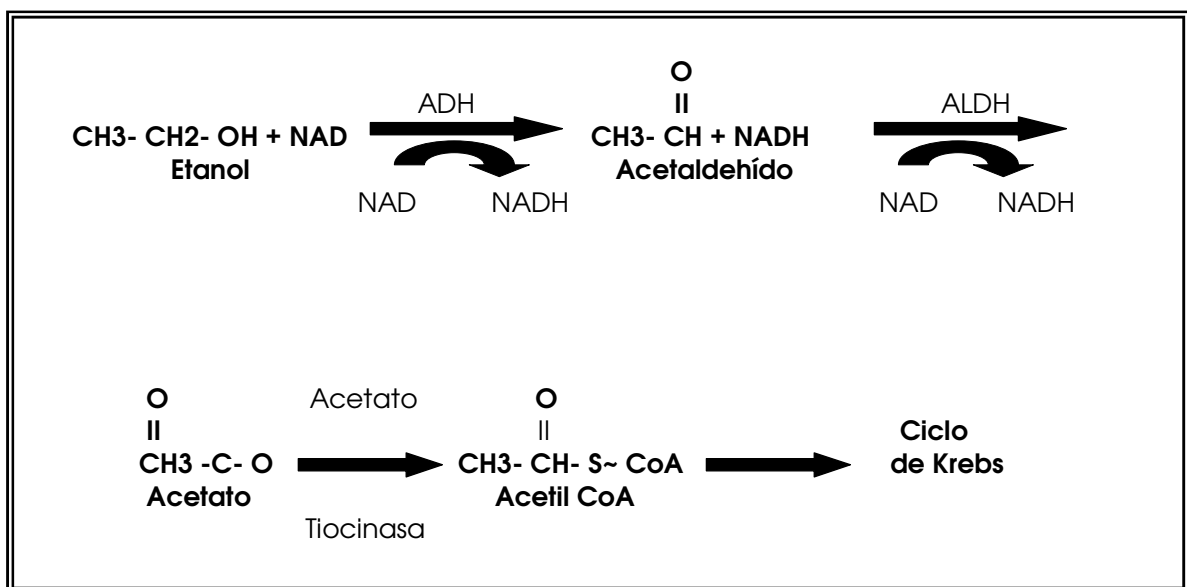


Figura 1. Esquema del metabolismo fundamental del etanol. La enzima citosólica alcohol-deshidrogenasa (ADH) cataliza la conversión de etanol hasta acetaldehído. Esta reacción está acoplada con un aceptor de hidrogeno NAD que es reducido hasta NADH . Después el acetaldehído es transformado a acetato a través de la aldehído-deshidrogenasa (ALDH) utilizando NAD como cofactor. Finalmente, la acetato-tiocinasa metaboliza al acetato en acetil coenzima A.

Finalmente, la acetato-tiocinasa metaboliza al acetato en acetil coenzima A, que se incorpora al ciclo de Krebs para formar CO_2 y H_2O o bien es utilizada para la síntesis de ácidos grasos u otros constituyentes (Figura 1) (ref. ver Hunt, 1996). Además del aparato enzimático mencionado, existen otros dos sistemas que catalizan la conversión de etanol a ACH: el citocromo P450 y la catalasa (Warner y Gustafsson, 1994; Aragon y cols, 1992; Lieber, 1997). El citocromo P450 es un complejo enzimático involucrado en la detoxificación de drogas y

toxinas en el hígado y puede expresarse en varias formas. La forma más involucrada en el metabolismo del etanol es el citocromo P450 2E1. Este citocromo ha sido identificado en el cerebro y puede ser encontrado en neuronas y glía (Hansson y cols, 1990). La catalasa funciona como regulador de los niveles de peróxido de hidrógeno y se ha demostrado que en presencia de este compuesto, el etanol puede ser oxidado hasta ACH *in vitro* por acción de la catalasa (Keilin y Martree, 1945).

Se ha propuesto que el ACH derivado del metabolismo del etanol en el hígado penetra desde el torrente sanguíneo hasta el cerebro con dificultad debido a la presencia de la aldehído-deshidrogenasa en la barrera hematoencefálica (Zimatkin, 1991). Para superar dicha barrera metabólica son necesarias concentraciones muy altas de ACH (>100 μM) (Tabakoff y cols, 1976). Estas concentraciones probablemente se alcanzan cuando se inyectan dosis altas de ACH por vía IP; incluso, se han observado niveles muy altos de ACH en ratas inyectadas con etanol después de la inhibición de la aldehído-deshidrogenasa (Jamal y cols, 2003^a). Por otro lado, en pacientes alcohólicos crónicos se han detectado niveles de ACH tan altos como 30 μM (Hatake y cols, 1990). Aún más, existe un reporte de individuos japoneses con niveles de ACH en sangre equivalentes a 548 μM (Watanabe y cols, 1985).

Existe discusión acerca de la capacidad del ACH para atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, en varios estudios se ha comprobado la formación de ACH a través del metabolismo de etanol directamente en el cerebro. La evidencia experimental apunta hacia la oxidación central del etanol

por medio del sistema catalasa- H_2O_2 como un factor importante para explicar los efectos neurotóxicos observados después de la administración de etanol. Se ha demostrado que el etanol es metabolizado a ACH en homogenizados de cerebro de rata (Aragon y cols, 1992) así como en cultivos de tejido neuronal (Hamby-Mason y cols, 1997) por medio de la actividad peroxidativa de la catalasa. Otras vías podrían estar también involucradas en el metabolismo del etanol y en la producción de ACH en el cerebro. Un estudio reciente reportó la presencia de alcohol-deshidrogenasa dentro de regiones muy específicas del cerebro de la rata como cerebelo, hipocampo y corteza. Estos datos sugieren que esta enzima podría estar contribuyendo a la producción de ACH en estas áreas (Martínez y cols, 2001). En conclusión, el ACH puede acumularse en el cerebro después de la inyección de dosis altas y mediante el propio metabolismo del etanol localizado en el cerebro.

b) Efectos del acetaldehído sobre el SNC

En general se ha asumido que los efectos conductuales y neuroquímicos descritos después de la ingesta o administración de alcohol son debidos a la acción *per se* del etanol en el sistema nervioso central. Sin embargo, desde hace varios años muchos estudios han postulado el papel que podría tener el ACH sobre algunos de los efectos provocados por el etanol. No obstante, aún no se ha establecido por completo cómo es la participación que tiene este metabolito.

La intoxicación por alcohol induce un amplio rango de efectos sobre la memoria, desde defectos en la memoria a corto plazo después del consumo de cantidades

moderadas de etanol hasta lagunas o completa incapacidad para formar recuerdos a largo plazo. A nivel celular, se ha sugerido que el etanol afecta la memoria a través de la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP, siglas en inglés). El LTP es un incremento duradero de la eficacia sináptica y es a menudo descrito como la base celular potencial de la memoria (Goosens y Maren, 2002). Varios estudios han mostrado que el etanol inhibe de manera dosis-dependiente el LTP tanto *in vivo* como *in vitro* (Blitzer y cols, 1990). Existen muy pocos estudios que han investigado el papel del ACH en el desajuste de la memoria inducido por el etanol. Quizá el más significativo es el publicado por Abe en 1999, en donde se muestra que el ACH, al igual que el etanol, inhibe *in vivo* la inducción de LTP en el giro dentado de la rata. Este efecto fue visible después de la administración tanto sistémica (oral e intravenosa) como intracerebroventricular (ICV) de ACH, lo que indica que el ACH es capaz de afectar al fenómeno LTP directamente, al menos 10 veces mas potentemente que el etanol.

Varios modelos animales han sido desarrollados para probar los efectos reforzadores y adictivos de las drogas; sin embargo, los protocolos de auto-administración de las drogas y el condicionamiento por un lugar son actualmente los más usados. Debido a la especulación de que el ACH tiene un papel importante en el abuso del alcohol, se han realizado varios estudios para tratar de asignar un papel determinante del ACH. Los primeros estudios reportaron que las ratas podían auto-administrarse ACH (1-5% v/v) directamente en los ventrículos cerebrales (Brown y cols, 1979). También se ha demostrado que la

administración periférica de ACH induce la auto-administración en ratas (Myers y cols, 1984). Estos estudios han demostrado que la auto-administración de ACH es mucho más fácil de establecer que la auto-administración de etanol, indicando que el ACH es un reforzador más fuerte que su precursor el etanol. Recientemente, se propuso que el ACH es un reforzador 1000 veces más potente que el etanol cuando se auto-administra en el área ventral tegmental (Rodd-Hendricks y cols, 2002). Dicha región del cerebro esta involucrada en las acciones reforzadoras del etanol. Las propiedades reforzadoras del ACH también han sido estudiadas y confirmadas en modelos de condicionamiento por el lugar. Smith y cols (1984) reportaron que múltiples infusiones ICV de ACH producen preferencia condicionada por el lugar, sugiriendo que el ACH administrado centralmente puede producir efectos reforzadores positivos. De igual forma, se ha descrito que las ratas también exhiben una fuerte preferencia por un lugar o un estímulo que ha sido asociado con inyecciones IP de ACH (20-50 mg/kg) (Quertemont y De Witte, 2001). En conclusión, el ACH muestra propiedades reforzadoras en ratas no importando la ruta de administración, ya sea sistémica o central.

Se ha sugerido que el ACH puede ejercer algunos de sus efectos conductuales a través de algunas alteraciones en la actividad y metabolismo de neurotransmisores; sin embargo esto permanece sin esclarecerse. Existen muy pocos reportes actuales que describan el efecto del ACH sobre el contenido de monoaminas. Los primeros experimentos revelaron que la administración aguda indujo una disminución significativa de NA (Thadani y Truitt, 1977) y de

5-HT (Duritz y Truitt, 1966). No existe evidencia que indique que el ACH interactúa significativamente con la neurotransmisión GABAérgica o glutamatérgica. Mediante la medición de los niveles extracelulares de aspartato, glutamato y GABA se observó que no había alteraciones después de la administración de ACH (Ward y cols, 1997). El sistema dopaminérgico mesolímbico está fuertemente involucrado en el reforzamiento del etanol, de esta forma se ha intentado averiguar si las propiedades reforzadoras del ACH están mediadas por un incremento en la liberación de DA dentro del núcleo accumbens y otras regiones límbicas. De acuerdo con esta idea, recientemente se mostró que el ACH incrementa la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del AVT (Foddai y cols, 2004). Se ha reportado que las ratas se auto-administran ACH en el área ventral tegmental y que esta auto-infusión se reduce con la administración de un agonista de los receptores dopaminérgicos D₂ (Rodd y cols, 2004). Estos resultados sugieren que las propiedades reforzadoras del ACH están mediadas por la activación de las neuronas dopaminérgicas en el sistema mesolímbico.

Existen muchos estudios que describen la acción aguda y crónica del etanol sobre el ciclo sueño vigilia. Sin embargo, todavía no hay reportes que muestren detalles acerca de los efectos del ACH sobre los parámetros de sueño de la rata y solamente pocos reportes, han encontrado que el ACH modifica el contenido de monoaminas implicadas en la regulación del sueño (Duritz y Truitt, 1966; Thadani y Truitt, 1977). Recientemente Franco y cols. (2006) publicaron un artículo en el cual se determinó que el ACH provoca disminución

del tiempo total en sueño de movimientos oculares rápidos e incremento del sueño de ondas lentas.

Se ha propuesto que el ACH es responsable de algunas acciones neurofarmacológicas después de la ingesta de etanol (Hunt, 1996), tales como un aumento en el disparo neuronal (Fodaí y cols, 2004), cambios en los sistemas de neurotransmisión central (Ward y cols, 1997; Heap y cols, 1995) y algunas alteraciones neurofisiológicas (Abe y cols, 1999; Franco-Pérez y cols, 2006). Esta hipótesis de que el ACH es en parte responsable de muchas acciones del etanol ha sido aún mas apoyada por el hecho de que el ACH es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica después de la administración de una sola dosis (220 mg/kg) por vía sistémica (Heap y cols, 1995).

La mayoría de los estudios de locomoción han reportado efectos depresivos después de la administración periférica de ACH. Holtzman y Schneider (1974) fueron los primeros en medir efectos depresivos locomotores en el primer minuto después de la administración intravenosa de ACH. Estudios posteriores han mostrado que los efectos depresivos del ACH aparecen con dosis mayores que 50 mg/kg de peso (Quertemont y cols, 2005). Las inyecciones IP de ACH inducen depresión locomotora dosis-dependiente en ratones de las cepas C57BL6/J y CD1. Incluso, se demostró que ratones pre-tratados con cianamida, un inhibidor de la aldehído-deshidrogenasa, presentan disminución en los niveles de actividad locomotora después de la administración de 2-3 g/kg de etanol (Quertemont y cols, 2004). Estos resultados muestran claramente que el incremento en la concentración de ACH en sangre y cerebro ocasionado por la

inhibición de la enzima aldehído-deshidrogenasa potencia los efectos depresivos locomotores del etanol. El hecho de que estos resultados indiquen que el ACH es principalmente una droga depresora, evidencia la posibilidad de contribuir con los efectos sedantes y depresores del etanol. Sin embargo, existe controversia por los efectos que se presentan ya que estos dependen de la vía de administración. De esta forma, el ACH parece ser principalmente depresor cuando se inyecta periféricamente, mientras que es un estimulante cuando se perfusa directamente en el cerebro. Se ha observado que el ACH administrado en los ventrículos laterales incrementa la actividad locomotora. Las infusiones ICV de ACH pueden producir un patrón de activación motora a dosis moderadamente bajas, inclusive, el ACH induce incremento en la conducta exploratoria (Correa y cols, 2003). Este resultado es similar al efecto producido por la administración ventricular de etanol. Aún no existe una explicación para comprender las discrepancias observadas en los resultados. Claramente se necesitan más estudios para entender las diferencias en los efectos observados después de la administración central o periférica de ACH.

A pesar de que existen pocos estudios respecto a los efectos del ACH sobre el contenido de los neurotransmisores, algunos trabajos han demostrado que la administración intraperitoneal (ip) de ACH es capaz de disminuir la concentración de DA y DOPAC en el cerebro (Ward y cols, 1997; Heap y cols, 1995).

De manera interesante, no existen reportes en la literatura que describan los efectos del ACH sobre los patrones de locomoción y el metabolismo de la DA inducidos por MK-801. Esto es sorprendente debido a que algunos de los efectos del ACH en el cerebro parecen antagonizar a los del MK-801.

La principal relación entre el ACH y el MK-801 se debe al hecho de que el glutamato a través de su interacción con los receptores NMDA, regulan la locomoción y modulan estrechamente la actividad del sistema dopaminérgico debido a que se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica. En esta investigación se bloquearon específicamente éstos receptores con el antagonista no competitivo MK-801. Este bloqueo provoca un aumento en la concentración de DA lo cual se traduce conductualmente en hiperlocomoción. Por el contrario, el ACH tiende a disminuir las concentraciones de DA provocando hipolocomoción.

Este estudio nos permitirá profundizar sobre la forma en que actúa el ACH, utilizando al MK-801 como herramienta experimental ya que su acción farmacológica y conductual ha sido previamente caracterizada. La interacción del MK-801 con el ACH nos sugerirá que probablemente este último, actúa principalmente sobre el sistema dopaminérgico. Investigar los mecanismos del ACH es de gran relevancia ya que puede ser una clave o una aproximación importante dentro del estudio de la toxicidad del etanol.

IV. Hipótesis

Se sabe que la administración sistémica de MK-801 produce un incremento en el patrón de locomoción de la rata, que está relacionado con un incremento en los niveles de DA. Por otro lado se ha observado que altas dosis de ACH reducen la locomoción así como las concentraciones de DA. Tomando en cuenta esto, es posible que la administración de ACH revierta la hiperlocomoción inducida por el MK-801, lo cual, probablemente esté correlacionado con la disminución que produce el ACH sobre la concentración y el metabolismo de la DA.

V. Objetivos:

General

Determinar la posible existencia de modificaciones en los patrones de locomoción de la rata, las concentraciones de DA y sus metabolitos después de la administración del ACH, el MK-801 y su administración conjunta.

Particulares

1. Determinar la actividad locomotora en ratas administradas con ACH, MK-801, así como la combinación de ambos fármacos:

Medir los movimientos horizontales

Medir los movimientos ambulatorios

2. Evaluar los efectos de la administración de ACH, MK-801 y ambos fármacos sobre las concentraciones de DA, DOPAC, HVA y la relación DOPAC/DA.

2.1 Cuantificación en cuerpo estriado

2.2 Cuantificación en corteza frontal.

VI. Material y métodos

a) Animales

En este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g). Todos los animales se mantuvieron en cámaras de acrílico, provistas con agua y comida *ad libitum*. Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$), luz (ciclos de luz/obscuridad 12:12). Todos los animales fueron adecuadamente tratados para minimizar el dolor o el malestar de acuerdo a las regulaciones especificadas por el comité de uso y cuidado de animales de nuestra institución, así como de los estándares señalados por los Institutos Nacionales de Salud de México.

Para la administración de MK-801 (Sigma chemical Co., St. Louis, MO) y del ACH (Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland) se utilizó solución salina como vehículo. Las soluciones de los fármacos se prepararon diariamente y se administró 1 ml/300 mg de peso corporal.

b) Diseño experimental

Los animales se dividieron en 4 grupos experimentales. Cada grupo recibió dos inyecciones separadas por un periodo de 20 minutos. Se administró primero el MK-801 debido a que sus efectos conductuales se presentan 20 minutos después de su administración sistémica mientras que el ACH presenta efectos conductuales inmediatamente.

Los tratamientos o grupos fueron los siguientes:

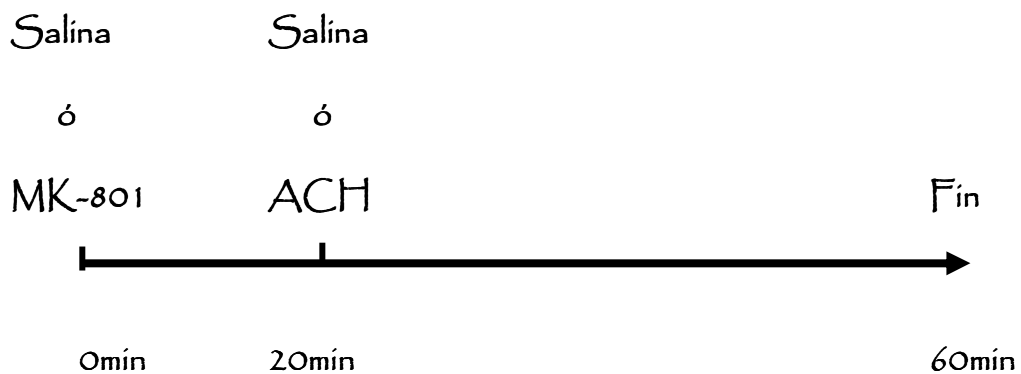
1) **Control** (salina/salina), administración ip de solución salina a los minutos 10 y 30 dentro de los 60 minutos totales considerados para los experimentos conductual (n=11) y neuroquímico (n=14).

2) **ACH** (salina/ACH (200 mg/kg)), administración ip de solución salina y ACH a los minutos 10 y 30 de los experimentos conductual (n=11) y neuroquímico (n=14).

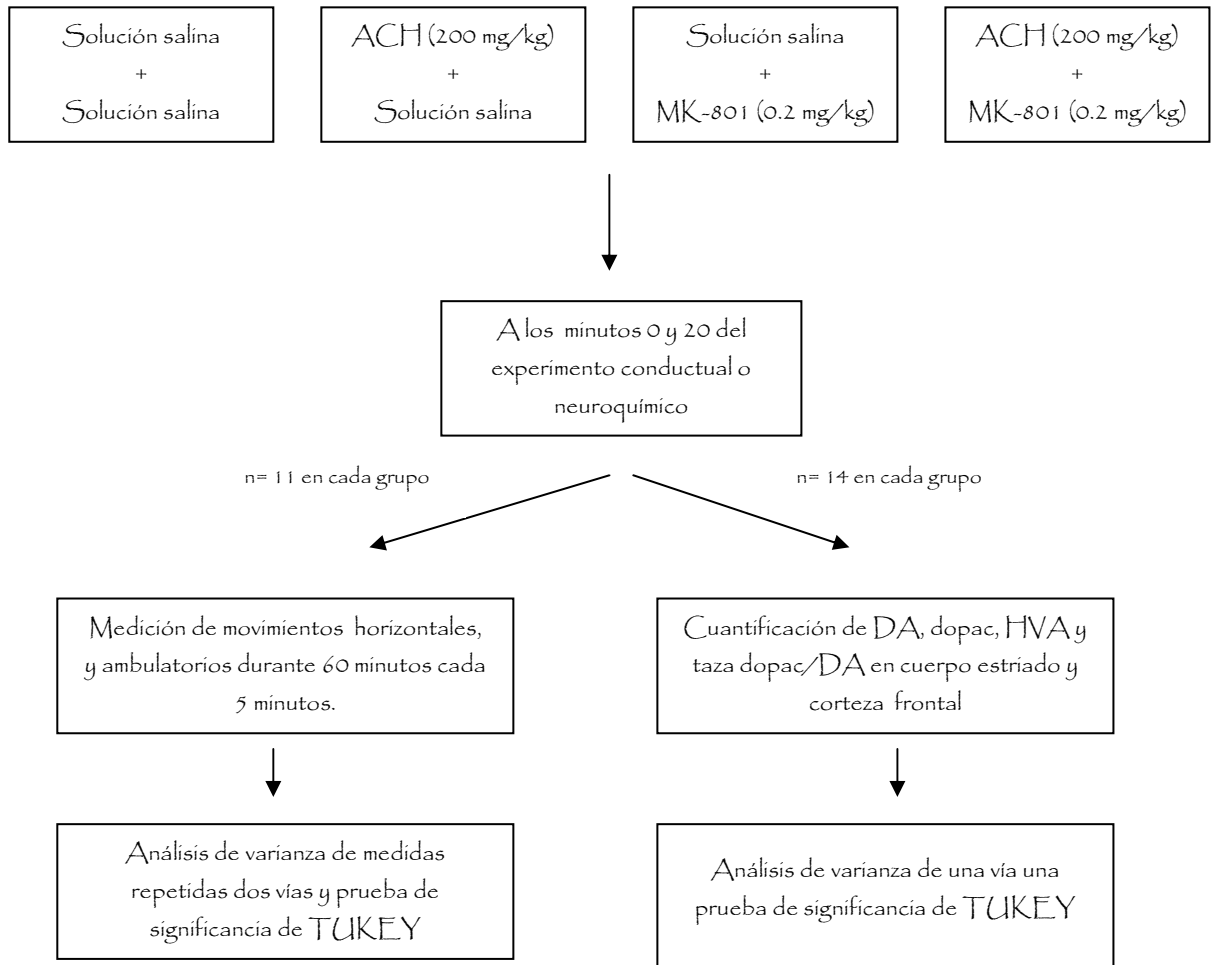
3) **MK-801** (MK-801 (0.3 mg/kg)/salina), administración ip de MK-801 (0.2 mg/kg) y solución salina a los minutos 10 y 30 de los experimentos conductual (n=11) y neuroquímico (n=14).

4) **MK-801/ACH** (MK-801 (0.3 mg/kg)/ACH (200 mg/kg)), administración ip de y MK-801 (0.2mg/kg) y ACH (200mg/kg), a los minutos 10 y 30 de los experimentos conductual (n=11) y neuroquímico (n=14).

Esquema de tiempos de administración:



c) Diagrama:



d) Estudio conductual

Todos los animales fueron habituados a la manipulación humana y al lugar del experimento, siete días previos a la medición de movimiento. Antes de comenzar la cuantificación todos los individuos fueron sometidos a 30 minutos de habituación en el aparato para medir la locomoción. El tiempo de cuantificación total tuvo una duración de 60 minutos tomando las mediciones del número de movimientos horizontales, verticales y ambulatorios, cada 5 minutos. Las

administraciones farmacológicas fueron realizadas como ya se mencionó en cada animal a los minutos 10 y 30 después del inicio del experimento que tuvo una duración de 60 minutos.

La locomoción fue evaluada en un aparato opto-varímex (Columbus instruments) con sensores de movimiento que determinan por interrupciones de los haces de luz, el número de movimientos verticales, horizontales y ambulatorios. El aparato tiene un campo abierto que está rodeado de cuatro altas paredes removibles de acrílico, donde se coloca al individuo en libre movimiento. Automáticamente, el aparato da la lectura del número de veces que la rata cruzó el haz de luz y dependiendo la colocación del sensor luminoso, y el movimiento de la rata, el movimiento cuenta como vertical, horizontal o ambulatorio.

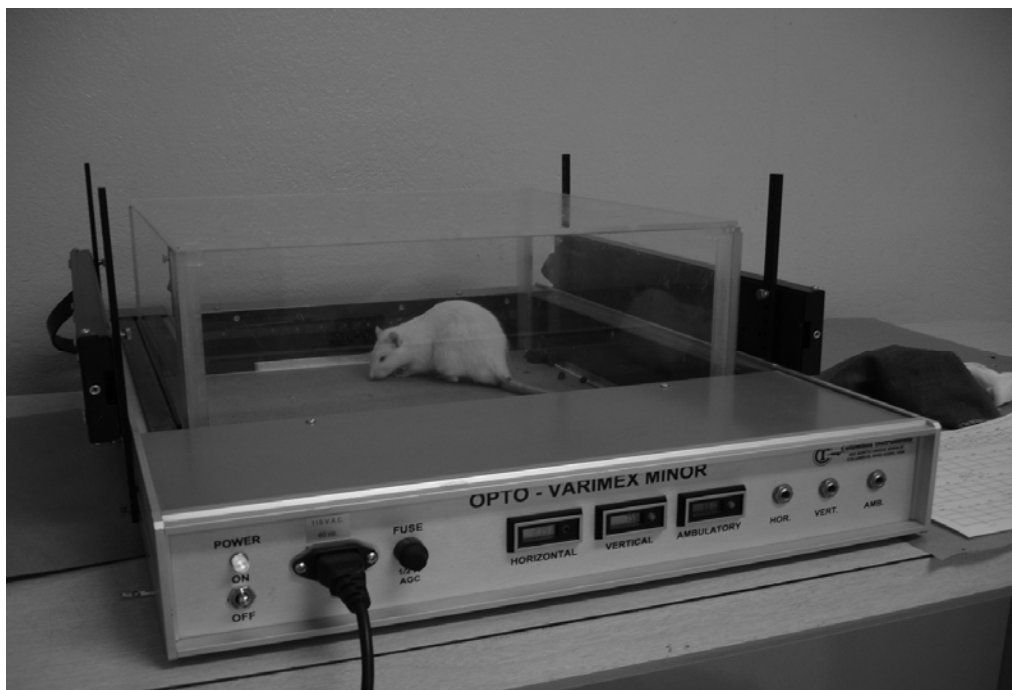


Figura 2. Para medir la conducta se utilizó un aparato opto-varímex que cuantifica específicamente patrones de locomoción (movimientos horizontales y ambulatorios). Los animales se colocan en el centro de la cámara translúcida y la interrupción en los sensores luminosos, con el movimiento del animal son cuantificados automatizadamente.

e) Estudio neuroquímico

Para el análisis neuroquímico se utilizaron los mismos tratamientos y el sacrificio se realizó después de 60 minutos con sus respectivas administraciones a los 10 y 30 minutos. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se extrajo el cerebro y se disectaron el cuerpo estriado y la corteza frontal. Las muestras fueron inmediatamente colocadas en hielo, sonicadas en 1 ml de solución de ácido perclórico 0.4N con 0.1% de metasulfito de sodio y centrifugadas durante 10 minutos a 15 rpm y 4°C. Los sobrenadantes fueron separados y almacenados en congelación a -70°C hasta su análisis cromatográfico. Los contenidos de DA, DOPAC, HVA, fueron analizados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado con un detector electroquímico. Se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer LC-250 con un detector electroquímico Metrohm. Los picos detectados fueron integrados con el software Total Chrome desarrollado por Perkin Elmer. Se utilizaron columnas analíticas para catecolaminas C18 100mm x 4.8mm con un tamaño de partícula de 3µm. La fase móvil estaba constituida de una solución acuosa de búfer de fosfatos (0.1 M, pH 3.2) la cual contenía 0.2 mM de octil sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y 15% (v/v) de metanol. El flujo utilizado fue de 1.2 ml/min y el potencial fue fijado a 0.80 V contra Ag/AgCl electródo de referencia.

f) Análisis estadístico.

Para los datos conductuales, se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de medidas repetidas). Las comparaciones subsecuentes de las condiciones experimentales se realizaron con la prueba estadística de Tukey. Los datos neuroquímicos se analizaron utilizando un análisis de varianza de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey.

VII. Resultados

a) Actividad motora

No se encontraron diferencias significativas en la actividad motora horizontal cuando se comparó el grupo de solución salina/ACH con el grupo de solo solución salina/salina. En contraste, esta actividad se incrementó significativamente en el grupo MK-801/salina, este incremento se registró a partir del minuto 20 y hasta el final de la prueba de locomoción. En cambio, en el grupo co-administrado con MK-801/ACH encontramos una disminución significativa en la actividad motora horizontal comparada con el grupo MK-801/salina, ($F(3,527)=29.9$ $p<0.001$), (Fig. 3A). En el análisis de la actividad motora horizontal, encontramos que el MK-801 produce un incremento significativo que disminuye por la co-administración de ACH ($F(3,43)=29.4$ $p<0.001$), (Fig. 3B).

En la figura 4 se muestra el efecto del MK-801 y el ACH sobre la actividad ambulatoria. No se observaron cambios significativos después de la administración de salina/ACH. Sin embargo, la actividad ambulatoria se incrementó significativamente en el grupo de MK-801/salina, mientras que la co-administración de MK-801 con ACH reduce significativamente el efecto de ACH solo ($F(3,527)=32.8$ $p<0.001$), (Fig. 4A).

El análisis de la actividad total ambulatoria demostró que la inyección de MK-801 incrementa la locomoción, mientras que el ACH puede moderar la hiperlocomoción inducida por MK-801 ($F(3,43)=28.9$ $p>0.001$), (Fig. 4B).

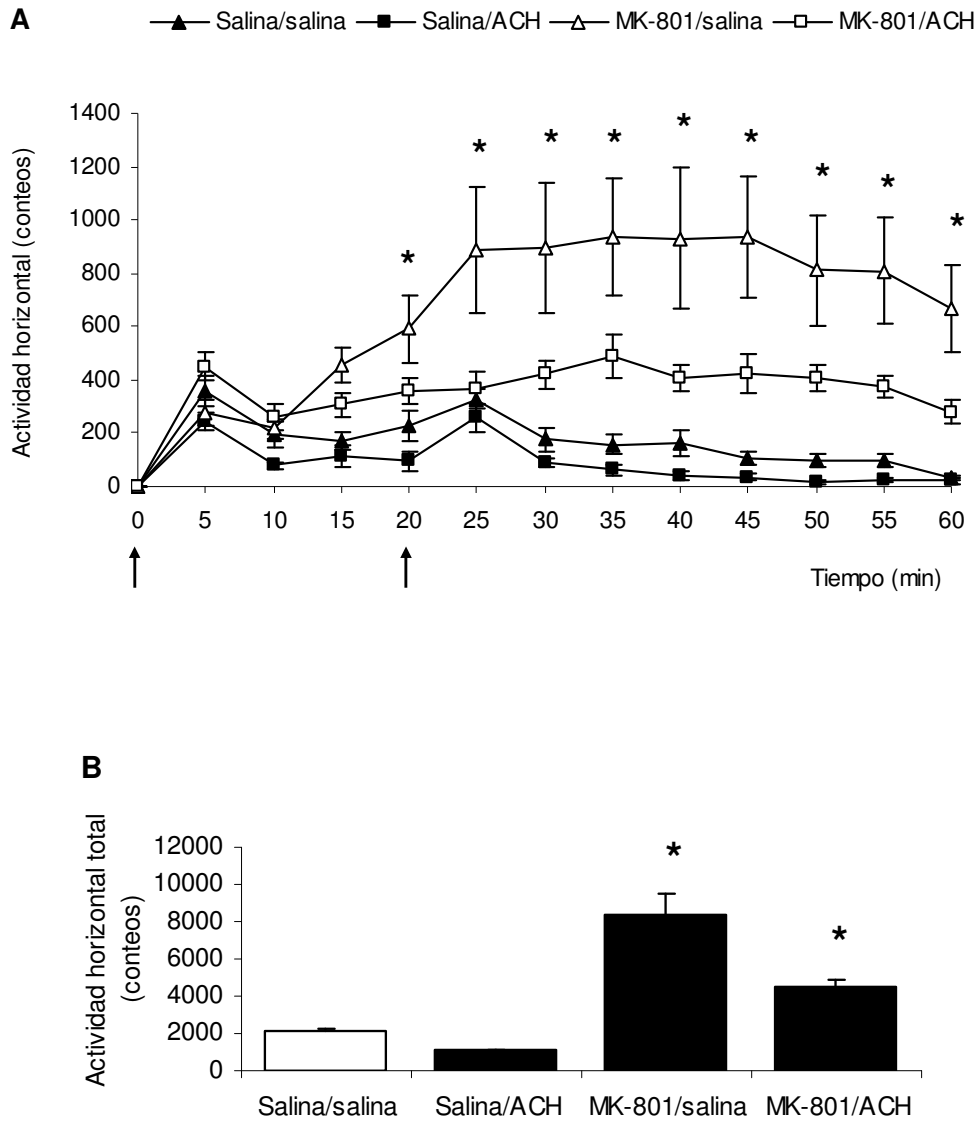


Figura 3. Efectos del ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) y su co-administración sobre la actividad motora horizontal. **A.** Los animales fueron administrados con salina/salina, salina/ACH, MK-801/salina o MK-801/ACH y se cuantificaron el número de movimientos horizontales cada 5 minutos por 60 minutos. Los resultados fueron estadísticamente comparados usando una prueba ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguidos por una prueba de significancia Tukey; *estadísticamente diferente de todos los grupos, $p < 0.001$. **B.** La actividad total fue cuantificada después de 60 minutos de la prueba de locomoción. Los resultados fueron estadísticamente comparados utilizando una prueba ANOVA de una vía seguida por un análisis post-hoc Tukey; *estadísticamente diferente de todos los grupos, $p < 0.001$. Las flechas indican los tiempos de administración.

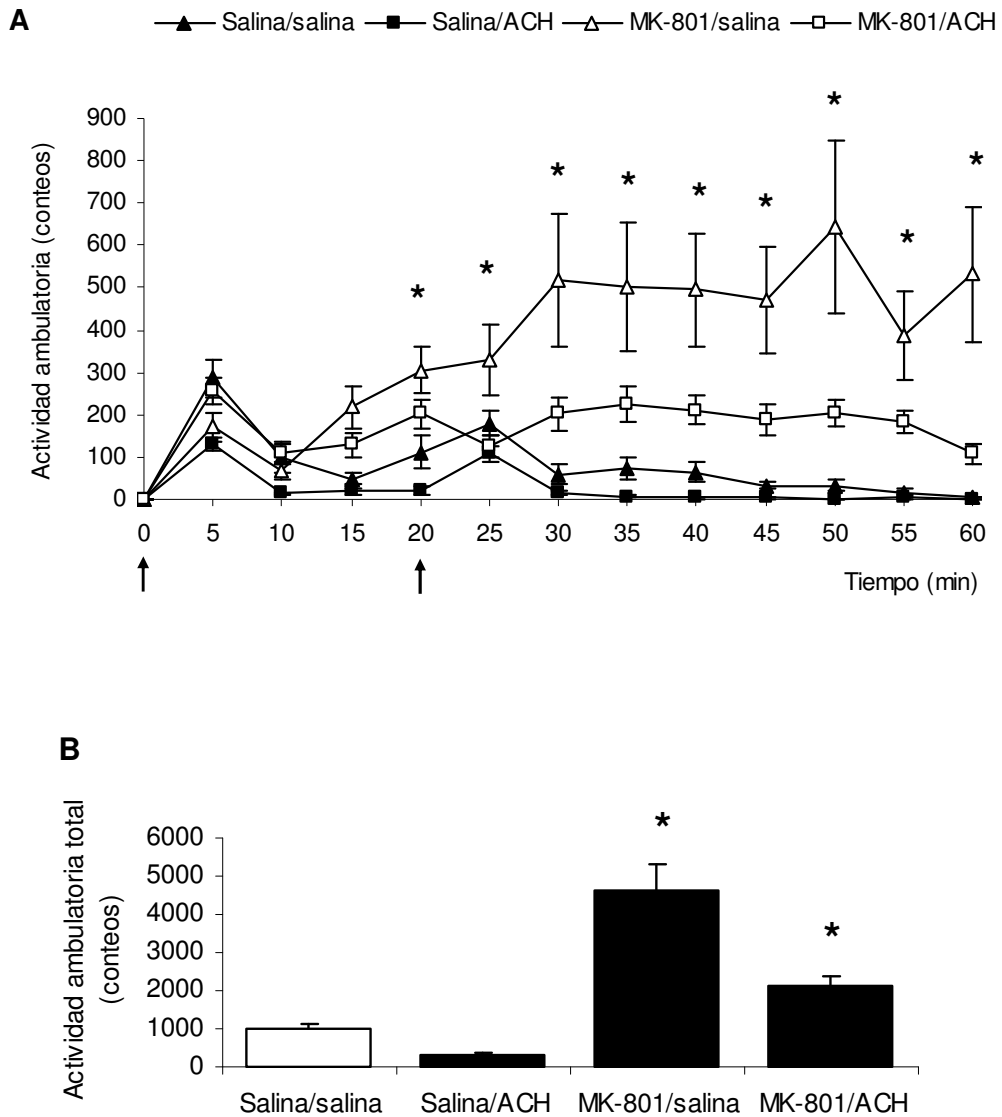
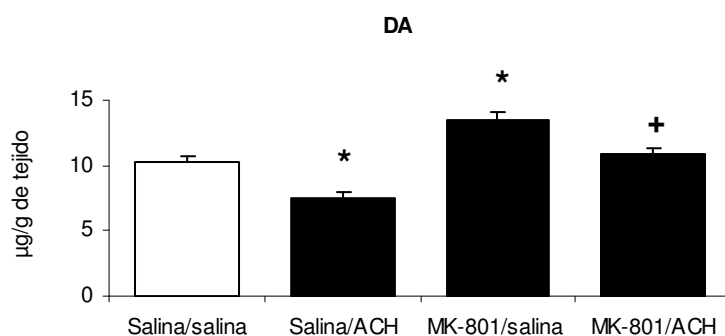


Figura 4. Efecto del ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) o su co-administración sobre la actividad ambulatoria. **A.** Los animales fueron administrados con salina/salina, salina/ACH, MK-801/salina o MK-801/ACH y el número de movimientos ambulatorios fueron cuantificados durante cada 5 minutos por 60 minutos. Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando una prueba ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguida por una prueba post-hoc de Tukey; *estadísticamente diferente de todos los grupos, $p < 0.001$. **B.** La actividad ambulatoria total se cuantificó después de 60 minutos del experimento locomoción. Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando una prueba ANOVA de una vía seguida por un análisis post-hoc de Tukey; *estadísticamente diferente de todos los grupos, $p < 0.001$. Las flechas indican los tiempos de administración.

b) Contenido de dopamina.

Encontramos que el contenido de dopamina estriatal disminuyó después de la administración de salina/ACH. En contraste, el MK-801 causó un incremento significativo de este neurotransmisor. De manera interesante, el aumento en ese grupo, fue revertido por la co-administración de MK-801 y ACH ($F(3,55)=23.4$ $p<0.001$), (Fig. 5). El contenido de metabolitos de DA (DOPAC y HVA) mostraron cambios similares: disminución de la concentración después de la inyección de salina/ACH, incremento de los niveles en el grupo de MK-801/salina y preservación de los niveles basales después de la administración de MK-801/ACH ($F(3,55)=37.6$ $p<0.001$ y $F(3,55)=23.7$ $p<0.001$, respectivamente). La tasa de DOPAC/DA presentó alteraciones solamente en el grupo MK-801/salina, ($F(3,55)=6.9$ $p<0.05$), (Fig. 5).



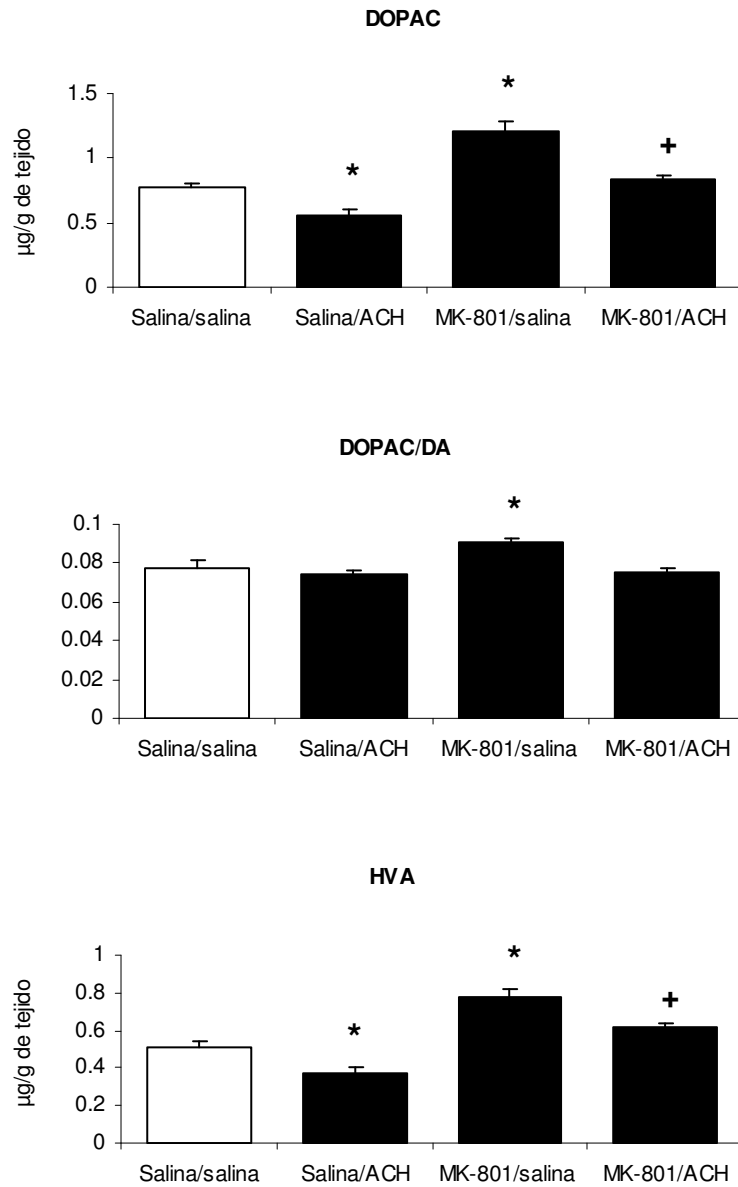
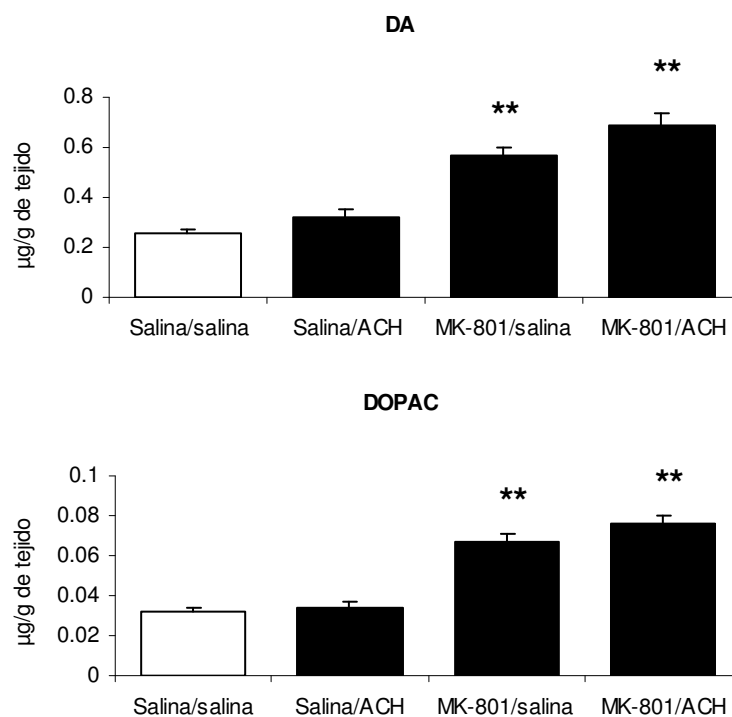


Figura 5. Concentraciones de DA, DOPAC, HVA, y tasa de recambio de DOPAC/DA en el Estriado de ratas administradas con salina/salina, salina/ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg)/salina o MK-801/ACH. Los resultados fueron comparados estadísticamente utilizando una prueba ANOVA de una vía seguida por un análisis post-hoc Tukey; *estadísticamente diferente de todos los grupos, $p < 0.05$; + estadísticamente diferente de los grupos salina/ACH y MK-801/salina, $p < 0.001$.

En la figura 6 se muestra el contenido de DA y sus metabolitos en la corteza frontal después del tratamiento con MK-801 y ACH. No se encontraron diferencias significativas después de la inyección de salina/ACH. En esta región cerebral, el contenido de DA se incremento en los grupos MK-801/salina y MK-801/ACH ($F(3,55)=38.2$ $p<0.001$), y el mismo efecto se observó en el contenido de DOPAC y HVA en los grupos MK-801/salina y MK-801/ACH ($F(3,55)=44.5$ $p<0.001$ y $F(3,)=15.2$ $p<0.001$, respectivamente). Finalmente, la tasa de DOPAC/DA que no presentó cambios significativos en la corteza frontal.



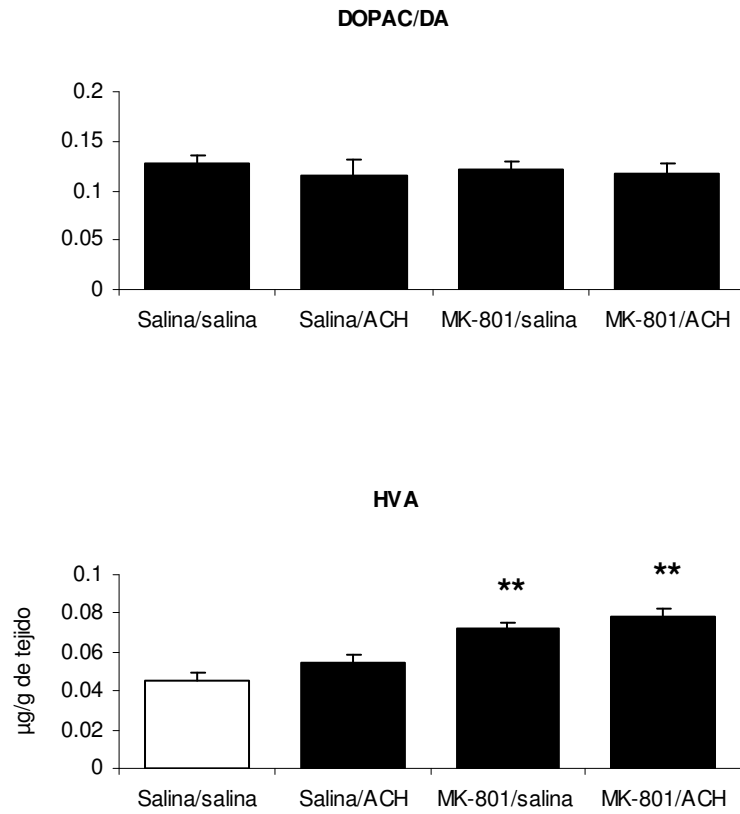


Figura 6. Concentraciones de DA, DOPAC HVA, y tasa de recambio DOPAC/DA en corteza frontal de ratas administradas con salina/salina, salina/ACH, MK-801/salina o MK-801/ACH. Los resultados fueron comparados estadísticamente usando una prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc; **estadísticamente diferentes de los grupos salina/salina y salina/ACH, $p < 0.001$.

VIII. Discusión

Los resultados de este estudio mostraron que el ACH es capaz de revertir parcialmente o atenuar los efectos de MK-801 sobre el patrón de locomoción y las concentraciones de DA en el estriado de rata, pero no así en la corteza frontal. Aunque en éste estudio se encontró que ACH provoca una ligera disminución en el patrón de actividad cinética basal, existen algunos reportes en la literatura que han mostrado el efecto opuesto. Nosotros atribuimos ésta discrepancia a la diferencia de dosis y vía de administración utilizada. Como ya se sabe, el etanol ejerce un efecto bifásico, dependiendo de la dosis, y podría ser que el ACH provoque el mismo efecto metabólico. Nuestra razón para utilizar una dosis alta de ACH en los experimentos fue provocar el efecto depresivo de ésta droga sobre el patrón de locomoción, como ocurre con una exposición aguda de altas dosis de etanol. Se sabe, que la administración de cianamida, inhibidor del aldehído-deshidrogenasa, reduce la locomoción después de la administración de etanol (Sanchis-Segura y cols., 1999). Esto sugiere que la elevación en la concentración de ACH en sangre y cerebro, aumenta el efecto depresor del etanol sobre la locomoción. En relación a la ausencia de efecto del ACH sobre la acción de MK-801 en corteza frontal, no encontramos ninguna explicación, aunque la proporción de neuronas DA a lo largo del CE es mayor, en comparación con la corteza frontal, pudiendo este hecho explicar de alguna manera los diferentes efectos encontrados.

Tomando en cuenta que el ACH es una molécula que exhibe características más tóxicas que su precursor etanol, se ha sugerido que puede ser el responsable

de varios efectos farmacológicos y conductuales del etanol, incluyendo los efectos observados sobre locomoción, hipnosis, aversión, consolidación y memoria (Hunt, 1996; Quertemont y cols., 2005^a y ^b). Como muchos otros sedantes o drogas depresoras, el etanol tiene un efecto bifásico complejo a través del tiempo y dosis, y se ha mostrado que posee un importante efecto estimulante psicomotor a relativamente dosis bajas (Correa y cols., 2003; Tambour y cols., 2006) Sin embargo, altas dosis de etanol producen efectos que están asociados con sedación, y está reportado, en términos generales, como supresor o como fármaco que disminuyen la actividad motora (Chuck y cols 2006). Así mismo, el ACH parece ser principalmente una droga depresiva cuando es administrada sistemáticamente, mientras que puede actuar como estimulante cuando se administra directamente en el cerebro (Quertemont y cols., 2004; Tambour y cols., 2006) De esta forma ha sido demostrado que la tendencia de éste efecto tiene una relación directa con la dosis administrada. En el presente estudio, empleamos una dosis farmacológica de ACH, más que una dosis fisiológica. En esta investigación se administró una dosis alta de ACH (200 mg/kg), la cual es similar a una dosis reportada anteriormente que probó tener un efecto a través de la barrera hematoencefálica (220 mg/kg) (Heap y cols., 1995). En estudios farmacocinéticos se ha considerado el hecho de que la administración de bajas de dosis de ACH (20-100 mg/kg) puede ser detectada en el cerebro, solo 10 minutos después de su administración sistémica (Ward y cols., 1997). De acuerdo con algunos reportes previos, nosotros confirmamos que la administración sistémica de MK-801 produce un incremento significativo

en el patrón de locomoción (Dai y cols., 1995; Irifune y cols., 1995; Cook y cols., 2004). De hecho, la hiperlocomoción inducida por el MK-801 ha sido propuesta como un modelo experimental de psicosis, ya que presenta algunos aspectos sintomáticos muy similares a esta enfermedad (Andiné y cols., 1999). La explicación más aceptada con respecto a éste efecto sobre la locomoción es que la inhibición del receptor NMDA, produce un incremento significativo en la DA, contenida en algunas áreas mesolímbicas ricas en este neurotransmisor, tales como NAc, VTA y CE. De este modo, estos cambios neuroquímicos encontrados han sido atribuidos también a un incremento en la actividad dopaminérgica en neuronas mesolímbicas (Zhang y cols., 1992; Murase y cols., 1993).

Por otro lado, las concentraciones de DA han sido cuantificadas después de la administración de ACH reportándose que una inyección sistémica de ACH provoca una disminución en la liberación de DA en NAc (Ward y cols., 1997), y en su contenido en el CE (Heap y cols., 1997), mientras que en el AVT se ha observado un incremento en el patrón de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Al-Khatib y cols., 2001). En cuanto a los estudios con etanol, existen resultados controversiales sobre el contenido de DA después de la administración sistémica, algunos estudios han demostrado que incrementa el metabolismo de DA (Fadda y cols., 1980; Heidbreder y De Witte, 1993; Kiiänmaa y cols., 1995), mientras que a dosis bajas, disminuye (Blanchard y cols., 1993), o incluso no tiene efecto en los niveles de DA (Dar y Wooles, 1984). Sobre el etanol se sabe que su administración altera la mayoría de los sistemas

de neurotransmisión y neuromodulación (Nevo y Hamon, 1995; Diamond y Gordon, 1997), y que estos cambios son dosis y tiempo dependientes. Existen algunos ejemplos de disminución en los niveles de DA (Blanchard y cols., 1993), y neurotransmisión (Budygin y cols., 2001) después de la administración de etanol. Tomando en consideración que la mayor parte del etanol es convertido en ACH, se ha asumido que al menos una parte de los cambios y alteraciones en el SNC son debidos al ACH.

Por otra parte, se han publicado diferentes estudios que demuestran que MK-801 afecta la locomoción a través de las alteraciones en el sistema dopaminérgico (Liljequist y cols., 1991; Lapin y Rogawsky, 1995). No obstante, existen muy pocos estudios con respecto a los efectos de ACH sobre estos fenómenos, lo cual es extraño, ya que el ACH y el MK-801 parecen afectar la misma vía metabólica. Es importante analizar, que la DA, es capaz de formar un anillo cíclico no enzimático con el ACH, dando origen a un compuesto neuroactivo llamado salsolinol. Este compuesto se ha detectado en cerebro humano (Sjoquist y cols., 1982) y particularmente en CE y NAc de ratas de libre movimiento (Jamal y cols., 2003^a; Jamal y cols., 2003^b). En estudios clásicos se ha demostrado que el SAL produce cambios en el metabolismo catecolaminérgico, el cual incluye la liberación de catecolaminas almacenadas, inhibición de la recaptura de catecolaminas, e inhibición de enzimas como la MAO, catecol-O-metiltransferasa y tirosin-hidroxilasa (Heikkila y cols., 1971; Giovine y cols., 1976; Weiner y Collins, 1978). Nosotros observamos que la ACH revierte el incremento de DA inducido por MK-801 en el estriado. Por

lo tanto, nosotros proponemos que alguna porción de DA libre es usada para formar SAL, y éste compuesto podría estar produciendo la inhibición de algunas enzimas para el metabolismo DA, de éste modo, podría estar reflejándose en una disminución en los niveles DA, y así, contrarrestar los efectos de MK-801. Sin embargo, para confirmar ésta hipótesis, será necesario realizar futuros estudios que determinen la precisa participación de SAL en el efecto de ACH en la hiperlocomoción inducida por MK-801.

En resumen, nuestros resultados mostraron que la administración aguda de ACH en ratas, reduce la hiperlocomoción inducida por MK-801, disminuyendo también el metabolismo DA en el estriado, una región rica en DA.

Como consideración final, mientras que varios reportes han demostrado que el etanol inhibe el receptor NMDA (Lovinger y cols., 1989; Diamon y Gordon, 1997), sólo algunos muestran el efecto del ACH por sí mismo en procesos fisiológicos mediados por éste receptor, como en el LTP en hipocampo (Abe y cols., 1999). De forma interesante, nuestros resultados se correlacionan bien con otros estudios, demostrando que altas dosis de etanol pueden disminuir la actividad locomotora inducida por MK-801, confirmando que existe una interacción entre las acciones de etanol y MK-801 (Robledo y cols., 1991), que parece muy similar a lo que nosotros encontramos en éste estudio trabajando con el principal metabolito del etanol. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que ACH modula las alteraciones neuroquímicas y conductuales inducidas por MK-801 mediante modificaciones específicas en el metabolismo DA.

IX. Conclusiones

Con este trabajo de investigación se pueden concluir los siguientes puntos:

- A) La administración sistémica de ACH es capaz de reducir la hiperlocomoción inducida por el MK-801. Este cambio es inversamente proporcional a una disminución del metabolismo dopaminérgico que debido a la administración de MK-801 aumenta notablemente.
- B) Nuestra alta dosis de ACH, al igual que se ha reportado con etanol, disminuye el patrón de locomoción en ratas.
- C) Confirmamos que la administración de MK-801 induce hipercinesia y un incremento del metabolismo dopaminérgico en CE.
- D) Nuestros hallazgos sugieren que el ACH de alguna manera está modulando la respuesta neuroquímica que produce el MK-801 a través de modificaciones en el metabolismo dopaminérgico.

XI. Apéndice



December 20, 2007

Dr. Carlos Paz
Departamento de Neurofisiologia
Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia M.V.S.
Insurgentes Sur No. 3877
Col. La Fama, C.P.
14269 Mexico D.F.,
MEXICO

Dear Dr. Paz:

Thank you for the submission of your manuscript entitled "Effects of acetaldehyde on behavioral and neurochemical changes induced by MK-801 in rats" authored by Monica Padilla-de la Torre, Javier Franco-Perez, Abel Santamaria, Sonia Galvan, Edith Gonzalez and Carlos Paz for publication in the Annals of New York Academy of Science. I am happy to inform you that your manuscript has been accepted without any revision for publication in Annals. I will forward the manuscript to publisher and you will hear from them once the galley proof is ready.

Thank you very much for your contribution to Annals.

Sincerely

Syed Ali

Syed F. Ali, Ph.D.
Editor, Annals of NY Academy Proceeding
Senior Biomedical Research Scientist
Head, Neurochemistry Laboratory
Division of Neurotoxicology
National Center for Toxicological Research/FDA
Jefferson, AR 72079
Tel: 870- 543-7123; Fax: 870- 543-7745
Email: syed.ali@fda.hhs.gov

Padilla-de la Torre *et al.*: Acetaldehyde and MK-801

**EFFECT OF ACETALDEHYDE ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL
CHANGES INDUCED BY MK-801 IN RATS**

Mónica Padilla-de la Torre¹, Javier Franco-Pérez¹, Abel Santamaría², Sonia Galvan³, Edith González¹ and Carlos Paz¹@

¹*Departamento de Neurofisiología*

²*Laboratorio de Aminoácidos Excitadores*

³*Departamento de Neuroquímica*

*Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A.
México D.F. 14269, México.*

@ Corresponding author:

Dr. Carlos Paz,

Departamento de Neurofisiología

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.

Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México D.F., México

Tel: +52 55 5606 38 22

Fax: +52 55 5424 08 08

E-mail: paztres@servidor.unam.mx

Keywords: Acetaldehyde, MK-801, locomotion, dopamine metabolism.

ABSTRACT

Alterations in motor activity related to dopamine changes in some brain regions have been described as consequences of those modifications produced by systemic administration of MK-801 (a non-competitive NMDA receptor antagonist) in rats. Acetaldehyde (ACH), the main metabolite of ethanol, has been implicated in different alterations in the Central Nervous System after ethanol ingestion. ACH might exert some control on dopaminergic transmission through the formation of other compounds with dopamine, which eventually may modify dopamine content and its metabolism. In order to evaluate such hypothesis, in the present study we used Wistar rats to evaluate the effect of ACH on locomotor alterations and dopamine metabolism changes induced by MK-801. Our results show that MK-801-treated group had a significant increase in the locomotor activity. In contrast, we did not find significant differences in locomotion test after ACH administration. However, the group administered with both drugs showed a significant decrease in locomotor activity compared with MK-801 alone. The neurochemical analysis showed an increase in dopamine content in the striatum and frontal cortex after MK-801 administration though; the increase was reverted by 200 mg/ kg of ACH. In conclusion, these results indicate that ACH can be producing an antagonic-like effect on locomotor alterations and dopamine content changes induced by MK-801, thus modulating the MK-801-induced hyperlocomotion by interfering with dopamine metabolism.

INTRODUCTION

The non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist dizocilpine (MK-801), produces hyperlocomotion, stereotyped behavior and ataxia in rodents^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}. The MK-801-induced locomotor hyperactivity can be abolished or largely attenuated by depletion of endogenous dopamine (DA) after systemic administration of DA receptor antagonists⁸, or applied directly into the nucleus accumbens (NAc)^{9, 3}. These findings indicate that the major behavioral effects of MK-801 are DA-dependent. In addition, MK-801 has been shown to produce both, an increase in DA metabolism and content in some specific brain regions^{10, 2, 5}. Furthermore, there are some studies that have reported increase in the firing rate of mesoaccumbal and ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons^{11, 12}. Therefore, it has been hypothesized that the MK-801 has an active role of DA, particularly in some mesolimbic structures^{3, 13}.

On the other hand, there is strong evidence suggesting that some effects of ethanol on the brain could be due to ACH, its main metabolite. ACH has been proposed to be responsible of some neuropharmacological actions after ethanol ingestion¹⁴, such as excessive neuronal firing¹⁵, changes in some central neurotransmission systems^{16,17} and in some neurophysiologic disturbances^{18,19}. Such hypothesis has been sustained regarding that ACH is able to cross the brain blood-barrier after a single systemic dose administration (220 mg/kg)¹⁷.

Several locomotion studies have reported decreased motor patterns after the systemic administration of high doses of ACH^{20, 21}. Nonetheless, other reports have shown different results when the administration has been done directly in the cerebral ventricles where ACH displays locomotor stimulant properties even at low doses²². There are only few studies regarding the effects of ACH on the content of neurotransmitters. For instance, it has been demonstrated that the intraperitoneal

(ip) administration of ACH is able to decrease DA and DOPAC^{16, 17} concentrations in the brain.

Interestingly, there are no reports in literature describing the effects of ACH on the locomotion patterns and DA metabolism induced by MK-801, and this is surprising since some of the effects of ACH in the brain seem to be antagonistic to those of MK-801. Therefore, the present study was designed to provide information about the possible modulatory effect of the main metabolite of ethanol, ACH, on the effect of MK-801 and its relation with DA metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals and drugs administration. Adult male Wistar rats (250-300 g) were used throughout the study. Animals were housed in acrylic cages and provided with water and food *ad libitum*. The room was maintained under constant conditions of temperature ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humidity ($50 \pm 10\%$), and light (12:12 light/dark cycles). All animals were treated with suitable measures to minimize pain or discomfort according to the regulations specified by the Animal Care and Use Committee of our Institution, as well as following the standards of the National Institutes of Health of Mexico.

Saline solution was used as vehicle for administration of MK-801 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and ACH (Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland). Drug solutions were daily prepared and ip administered as 1 ml/300 mg of body weight. Animals were divided into four experimental groups. All groups received two injections separated by a 20-minutes period: (1) saline/saline, (2) saline/ACH (200 mg/kg), (3) MK-801 (0.3 mg/kg)/saline, (4) MK-801 (0.3 mg/kg)/ACH (200 mg/kg). We administered MK-801 first due that its behavioral effects have shown 20 minutes after systemic administration whereas, ACH show its behavioral effects immediately

Locomotion test. For the behavioral assessment, 11 animals per experimental group were used. All experiments were run between 8:00 am and 3:00 pm under standard conditions of temperature, lighting and noise. Motor activity (including horizontal and ambulatory activities), was monitored in a custom-made transparent Plexiglass box (45 x 45 x 25) inside an Optovarimex (Columbus instrument, Columbus, OH, USA) under light illumination (200 Lux). The number of light beam interruptions due to animal movements was automatically recorded and expressed as activity counts. Rats were habituated to the environmental conditions of the

room where the locomotion tests were performed since 5 days before the trial day. Routinely, animals were individually placed on the center of the box and allowed for a free navigation in the clear Plexiglass box over a 30 min period for habituation and 1 hr for locomotion test. The locomotion assessment started immediately after the first drug or vehicle administration. The counts of horizontal, ambulatory and vertical activity were recorded every 5 minutes during 1 hour. A brief interruption was made to the second drug or saline administration.

Dopamine quantification. For the neurochemical assessments, additional groups of animals (a minimum of 14 animals per group) were used under the same experimental conditions, but in an independent manner of those employed for behavioral tests. The neurochemical analysis was performed according to the following protocol. Rats were killed by decapitation and the striatum and frontal cortex were dissected out according to the technique described by Glowinsky and Iversen²³. Tissue samples were immediately placed on ice and sonicated in 1000 μ l of perchloric acid 0.4N with 0.1 % (w/v) sodium metabisulphite, followed by 10 min of centrifugation at 18,000 g (4°C). Supernatants were kept frozen at -70°C until the chromatographic analysis was performed.

DA, DOPAC (3,4- dihydroxyphenilacetic acid) and (homovanillic acid) HVA were analyzed by high resolution liquid chromatography with an electrochemical detector as has been previously described²⁴. A Perkin-Elmer LC-250 liquid chromatograph with a Bass electrochemical detector was used. Peaks were integrated with TotalChrom software developed by Perkin-Elmer. We used a 100 mm x 4.8 mm Alltech adsorbosphere catecholamine analytical column with 3 μ m of particle size. The mobile phase consisted of an aqueous potassium phosphate buffer solution (0.1 M, pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulphate, EDTA 0.1 mM and 15 %

(v/v) methanol. Flow rate was 1.2 ml/min. Potential was fixed at 0.80 V against an Ag/AgCl reference electrode.

Statistical analysis. For behavioral data, we used two-way repeated measures ANOVA. Subsequent comparisons within conditions were made using Tukey's test. The neurochemical data were analyzed using one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test.

RESULTS

Locomotor activity. We did not find significant differences in horizontal activity when the saline/ACH group was compared with saline/saline group. In contrast, the horizontal activity was significantly increased in the MK-801/saline group, and this increase was recorded from minute 20 and up to the end of the locomotion test. Interestingly, the group co-administered with MK-801/ACH showed a significant decrease in horizontal activity in comparison with MK-801/saline group, ($F(3,527)=29.9$ $p<0.001$), (Fig. 1A). When the total motor horizontal activity, was analyzed, we found that MK-801 produced an increase in this parameter that was diminished by the co-administration of ACH ($F(3,43)=29.4$ $p<0.001$), (Fig. 1B).

Figure 2 shows the effects of MK-801 and ACH on ambulatory activity. No significant changes were observed on ambulatory activity after saline/ACH administration. In contrast, this marker was significantly increased in the MK-801/saline group, while the co-administration of MK-801 with ACH significantly reduced the effect of MK-801 alone ($F(3,527)=32.8$ $p<0.001$), (Fig. 2A). The analysis of total ambulatory activity demonstrated that injection of MK-801 increases this activity, whereas ACH can moderate the MK-801-induced hyperlocomotion ($F(3,43)=28.9$ $p<0.001$), (Fig. 2B).

Dopamine content. We found that the striatal DA content decreased after saline/ACH administration. In contrast, MK-801 caused a significant increase of this neurotransmitter, and such effect can be reverted by mean of the co-administration of MK-801 and ACH ($F(3,55)=23.4$ $p<0.001$) (Fig. 3). The DA metabolites content (DOPAC and HVA) showed similar changes: decreased levels after saline/ACH injection, increased levels in the MK-801/saline group and preservation of basal levels after MK-801/ACH administration ($F(3,55)=37.6$

$p < 0.001$ and $F(3,55) = 23.7$ $p < 0.001$, respectively). The DOPAC/DA ratio was only altered in the MK-801/saline group, ($F(3,55) = 6.9$ $p < 0.05$) (Fig. 3).

Figure 4 shows frontal cortex DA and metabolites levels after MK-801 and ACH treatment. Interestingly, we did not find any significant difference after the saline/ACH injection. In this brain region, the DA content increased in both MK-801/saline and MK-801/ACH groups ($F(3,55) = 38.2$ $p < 0.001$), and the same effect was observed on DOPAC and HVA content in both MK-801/saline and MK-801/ACH groups ($F(3,55) = 44.5$ $p < 0.001$ and $F(3,55) = 15.2$ $p < 0.001$, respectively). Finally, the DOPAC/DA ratio did not suffer significant changes in the frontal cortex.

DISCUSSION

Results of this study show that ACH is able to revert or attenuate the effects of MK-801 on the locomotive pattern and DA concentrations in the rat striatum, but not in frontal cortex. Although we found that ACH slightly decreased the basal kinetic pattern of activity, there are several reports in literature showing an opposed effect. We attributed such discrepancy to differences in doses and in the administration route used. Since it is known that ethanol exerts a biphasic effect depending of its dosages, it is likely that its metabolite ACH might have the same effect. Therefore, the rationale for the use of a high dose of ACH in our experiments was to evoke the depressive effect of this drug on locomotion, as it occurs after an acute exposure of high doses of ethanol. In further support to these considerations, it is known that cyanamide administration, an aldehyde dehydrogenase inhibitor, reduces the locomotor activity after ethanol administration²⁵. This suggests that elevation of blood and brain ACH concentrations raise the locomotor depressive effects of ethanol. In regard to the lack of effect of ACH on the actions of MK-801 in frontal cortex, we do not have an explanation, although the proportion of DA neurons along the striatum, in comparison with that of frontal cortex is larger and this fact could account for a possible explanation of the differential effects observed.

ACH, a molecule exhibiting more toxic features than its precursor ethanol, has been suggested to be responsible of many of the pharmacological and behavioral effects of ethanol, including locomotive, hypnotic, aversive, reinforcement and memory effects^{14, 26}. As many sedative or depressant drugs, ethanol has a complex biphasic effect across time and dose, and has been shown to possess an important psychomotor stimulant effect at relatively low doses^{21, 22}. Nonetheless, higher doses of ethanol produce effects that are associated with sedation and are,

in general terms, reported to suppress or impair motor activity²⁷. Therefore, ACH seems to be mainly a depressive drug when is systemically administered, whereas it can act as a stimulant when is administered directly in the brain^{20, 21}. Thus, it has been demonstrated that the trend of its effect is in direct relation with the administered doses. In the present study, we employed a pharmacological dose of ACH, rather than a physiological dose. We administered a high single dose of ACH (200 mg/kg), which is similar to the one previously reported to be effective to cross the blood brain barrier (220 mg/kg)¹⁷. In pharmacokinetic studies, although of consideration is the fact that even lower doses of systemic ACH (20-100 mg/ kg) can be detected in the brain, only 10 minutes after its administration¹⁶.

In agreement with several previous reports, we confirmed that the systemic administration of MK-801 produces an enhancement in locomotor activity^{2, 6, 28}. Indeed, the hyperlocomotion induced by MK-801 has been accepted as a model of psychosis, since its effects are very similar, at least in some symptomatic aspects⁴. The most accepted explanation regarding its effect on locomotion is that of an inhibition of NMDA receptors which produces a significant increase in DA contents in some DA-enriched mesolimbic areas, such as NAc, VTA and the striatum. Consequently, these neurochemical changes have been attributed to an enhancement of dopaminergic activity in mesolimbic neurons^{11, 12}.

On the other hand, DA has been assessed after ACH administration, and previous reports have established that systemic ACH injection reduce both release¹⁶ and DA content¹⁷, and enhance their firing pattern of DA neurones¹⁵. There is a controversial results about DA content after ethanol administration, some studies have shown to increase the DA metabolism^{29, 30, 31}, whereas at low doses it decreases³², or even has no effect on DA levels³³. Furthermore, it has been shown that ethanol alters the majority of the neurotransmission and neuromodulatory

systems^{34, 35} and these changes are both dose and time-dependent. Examples are the depletion of DA levels³² and neurotransmission³⁶ after ethanol administration. Taking into account that ethanol is mostly converted into ACH, at least part of these changes is assumed to be due to ACH. There are also several studies showing that MK-801 affects locomotion through DA alterations^{1, 8}. However, very few studies exist regarding the effects of ACH on these markers, although, ACH and MK-801 seem to affect the same metabolic pathways. Interestingly DA, through a non enzymatic ring cyclization with ACH, is able to form the neuroactive alkaloid salsolinol (SAL). This compound has been detected in human brain³⁷ and more actually in the striatum and nucleus accumbens of free-moving rats^{38, 39}. Classic studies demonstrated that SAL produces changes on catecholamine metabolism which include release of stored catecholamines, inhibition of catecholamine reuptake and inhibition of enzymes like monoamine-oxidase, catechol-*O*-methyltransferase and tyrosine-hydroxylase^{40, 41, 42}. We observed that ACH revert the increase of DA content induced by MK-801 in striatum. Therefore, we assume that some portion of free DA is used to form SAL, and this compound could, in turn, produce inhibition on some key enzymes for DA metabolism, thereby leading to decreased DA levels, and so, counteracting for the effects of MK-801. However, in order to confirm this hypothesis, further studies will be needed to determine the precise participation of SAL in the effect of ACH on hyperlocomotion induced by MK-801.

In summary, our results show that an acute ACH administration to rats reduces the hyperlocomotion induced by MK-801, also decreasing the DA metabolism in the striatum, an enriched-DA region. Of final consideration, while many reports have demonstrated that ethanol inhibits the NMDA receptor^{35, 43}, only few show effects of ACH itself in processes mediated by these receptors, such as long term

potentiation in hippocampus¹⁸. Interestingly, our results correlate well with other studies demonstrating that high doses of ethanol can decrease the MK-801-induced locomotor activity, confirming that there is an interaction between the actions of ethanol and MK-801⁴⁴, which is likely to be similar to the one we found in this study with ACH. Our findings support the hypothesis that ACH modulates the MK-801-induced behavioral and neurochemical alterations through specific modifications in DA metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the scholarship number 182506 granted to Mónica Padilla-de la Torre from CONACyT-México.

REFERENCES

1. Liljequist, S. *et al.* 1991. Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *European J. Pharmacol.* 195: 55-61.
2. Dai, H., K. Gebhardt & R. Carey. 1995. Time course effects of MK-801: the relationship between brain neurochemistry and behavior. *Brain Res. Bull.* 36: 175-180.
3. Shridhar, N. *et al.* 1996. Role of dopaminergic mechanisms in the stimulatory effects of MK-801 injected into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 565-573.
4. Andiné, P. *et al.* 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1393-1408.
5. Al-Khatib, I. *et al.* 2001. Role of dopaminergic system in core part of nucleus accumbens in hyperlocomotion and rearing induced by MK-801 in rats: A behavioral and in vivo microdialysis study. *Jpn. J. Pharmacol.* 87: 277-287.
6. Cook, C. *et al.* 2004. Modulation of the locomotor activating effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK801 by dopamine D2/3 receptor agonists in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77: 309-318.
7. Mathé, J. *et al.* 1998. Non-NMDA excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area mediate systemic dizocilpine (MK-801) induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurosci. Res.* 5: 583-592.

8. Lapin, I. & M. Rogawski. 1995. Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists and catecholamine depleting agents on the locomotor stimulation induced by dizocilpine in mice. *Behav. Brain Res.* 70: 145-151.
9. Willins, D. *et al.* 1993. The role of dopamine and AMPA/kainate receptors in the nucleus accumbens in the hypermotility response to MK-801. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 881-887.
10. Svensson, A., E. Pileblad & M. Carlsson. 1991. A comparison between the non-competitive NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) and the competitive NMDA antagonist D-CPPene with regard to dopamine turnover and locomotor-stimulatory properties in mice. *J. Neural Trans. Gen. Sect.* 85: 117-129.
11. Zhang, J., L. Chiodo & A. Freeman. 1992. Electrophysiological effects of MK-801 on rat nigrostriatal and mesoaccumbal dopaminergic neurons. *Brain Res.* 590: 153-163.
12. Murase, S. *et al.* 1993. Effects of dizocilpine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: Differential actions on firing pattern related to anatomical localization. *J. Neural Transm.* 91: 13-25.
13. Qing-Shan, Y. *et al.* 1997. Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. *Brain Res.* 765: 149-158.
14. Hunt, W. 1995. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain -A review. *Alcohol.* 13: 147-151.
15. Foddai, M. *et al.* 2004. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology.* 29: 530-536.
16. Ward, R. *et al.* 1997. Acetaldehyde-induced changes in the monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 36: 225-232.

17. Heap, L. *et al.* 1995. The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem. Pharmacol.* 50: 263-270.
18. Abe, K. *et al.* 1999. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long-term potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1805-1810.
19. Franco-Pérez, J., M. Padilla & C. Paz. 2006. Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats. *Behav. Brain Res.* 174: 86-92.
20. Quertemont, E. *et al.* 2004. Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology.* 177: 84-92.
21. Tambour, S. *et al.* 2006. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* 172: 145-154.
22. Correa, M. *et al.* 2003. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res. Bull.* 62: 197-202.
23. Glowinsky, J. & LL. Iversen. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of H-norepinephrine, H-dopamine, and H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-659.
24. Diggory, G.L. & W.R. Buckett. 1984. An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection. Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. *J. Pharmacol. Meth.* 11: 207-217.

25. Sanchis-Segura, C. *et al.* 1999. Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: is there a functional link? *Psychopharmacology*. 144:83-89.
26. Quertemont, E., Tambour, S. & Tirelli, E. 2005. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Prog. Neurobiol.* 75: 247-274.
27. Chuck, T.L. *et al.* 2006. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci.* 79: 154-161.
28. Irifune, M. *et al.* 1995. Involvement of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 291-296.
29. Fadda, F. *et al.* 1980. Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* 27: 979-986.
30. Heidbreder, C. & P. De Witte. 1993. Ethanol differentially affects extracellular monoamines and GABA in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 477-481.
31. Kiianmaa, K. *et al.* 1995. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 29-34.
32. Blanchard, B. A. *et al.* 1993. Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17: 968-973.

33. Dar, M. & W. Wooles. 1984. The effect of acute ethanol on dopamine metabolism and other neurotransmitters in the hypothalamus and the corpus striatum of mice. *J. Neural Transm.* 60: 283-294.
34. Nevo, I. & M. Hamon. 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.* 26: 305-336.
35. Diamond I. & A. Gordon. 1997. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77: 1-20.
36. Budygin, E. *et al.* 2001. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 27-34.
37. Sjoquist, B., A. Eriksson & B. Winblad. 1982. Brain salsolinol levels in alcoholism. *Lancet.* 1: 675-676.
38. Jamal, M. *et al.* 2003. In vivo formation of salsolinol induced by high acetaldehyde concentration in rat striatum employing microdialysis. *Alcohol Alcohol.* 38: 197-201.
39. Jamal, M. *et al.* 2003. In vivo study of salsolinol produced by high concentration of acetaldehyde in the rat striatum and nucleus accumbens of free-moving rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27: 79S-84S.
40. Heikkila, R., G. Cohen & D. Dembiel. 1971. Tetrahydroisoquinoline alkaloids : uptake by rat brain homogenates and inhibition of catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179: 250-258.
41. Giovine, A., M. Renis & A. Bertolino. 1976. In vivo and in vitro studies on the effect of tetrahydropapoveroline and salsolinol on COMT and MAO activity in rat brain. *Pharmacology.* 14: 86-94.

42. Weiner, C.D. & M.A. Collins. 1978. Tetrahydroisoquinolines derived from catecholamines or DOPA : effects on brain tyrosine hydroxylase activity. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2699-2703.
43. Lovinger, D. M., G White, & Weight F. 1989. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 243: 1721-1724.
44. Robledo, P., W. Kaneko & C. Ehlers. 1991. Combined effects of ethanol and MK-801 on locomotor activity in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 513-516.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) or their co-administration on horizontal activity. A. Animals were administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH and horizontal counts were recorded every 5 minutes for 60 minutes. Results were statistically compared using two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. B. Total horizontal activity recorded after 60 minutes of locomotion test. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. Arrows indicate the administration trials.

Figure 2. Effects of ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) or their co-administration on ambulatory activity. A. Animals were administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH and ambulatory counts were recorded every 5 minutes for 60 minutes. Results were statistically compared using two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. B. Total ambulatory activity recorded after 60 minutes of locomotion test. The results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. Arrows indicate the administration trials.

Figure 3. Concentrations of DA, DOPAC and HVA, and DOPAC/DA ratio in the striatum of rats administered with saline/saline, saline/ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg)/saline or MK-801/ACH. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.05$; + statistically different from saline/ACH and MK-801/saline groups, $p < 0.001$.

Figure 4. Concentrations of DA, DOPAC and HVA, and DOPAC/DA ratio in frontal cortex of rats administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; **statistically different from saline/saline and saline/ACH groups, $p < 0.001$.

Figure 1

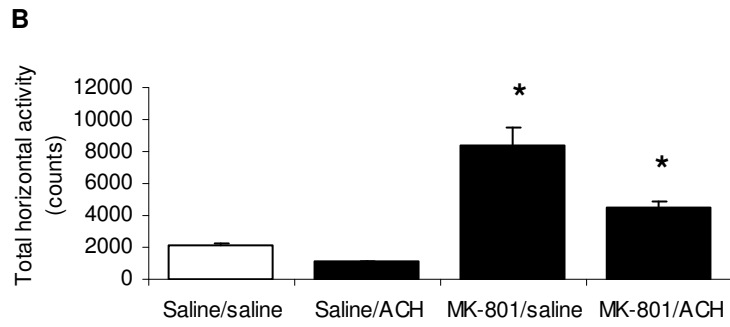
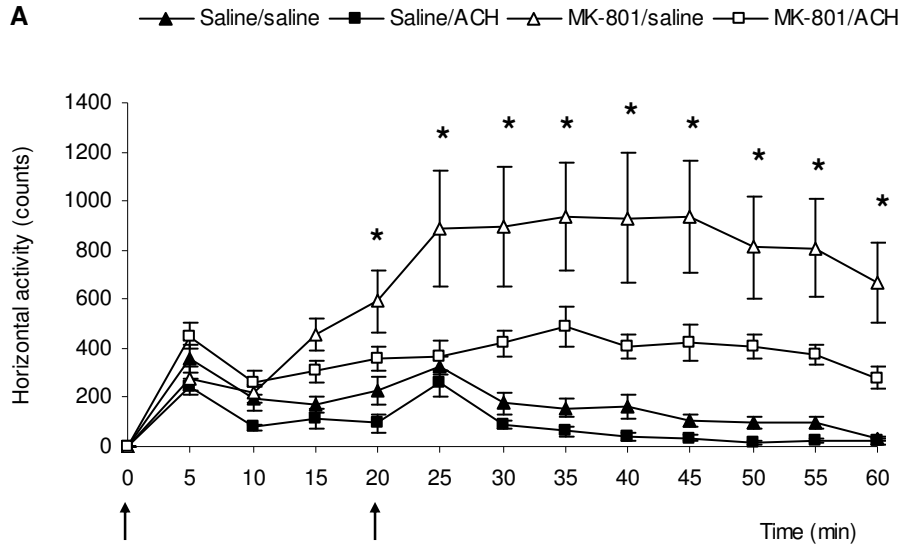


Figure 2

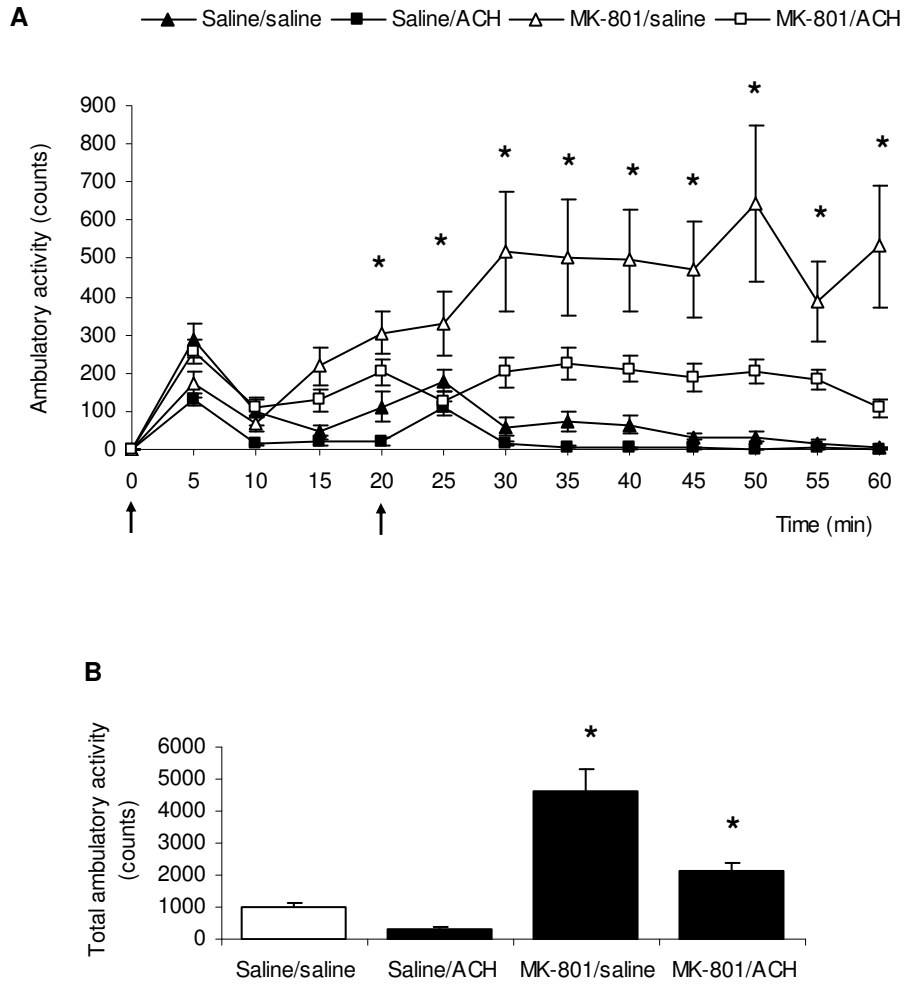


Figure 3

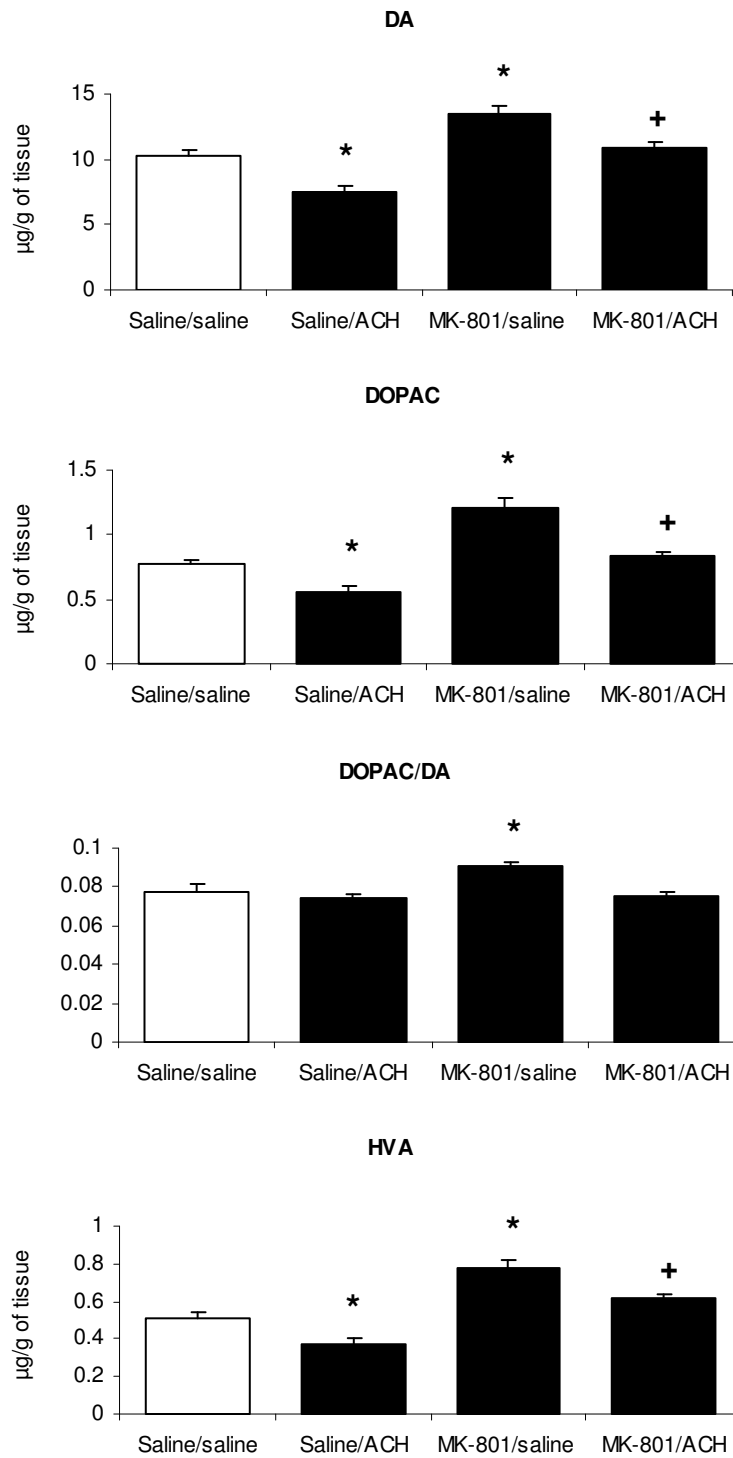
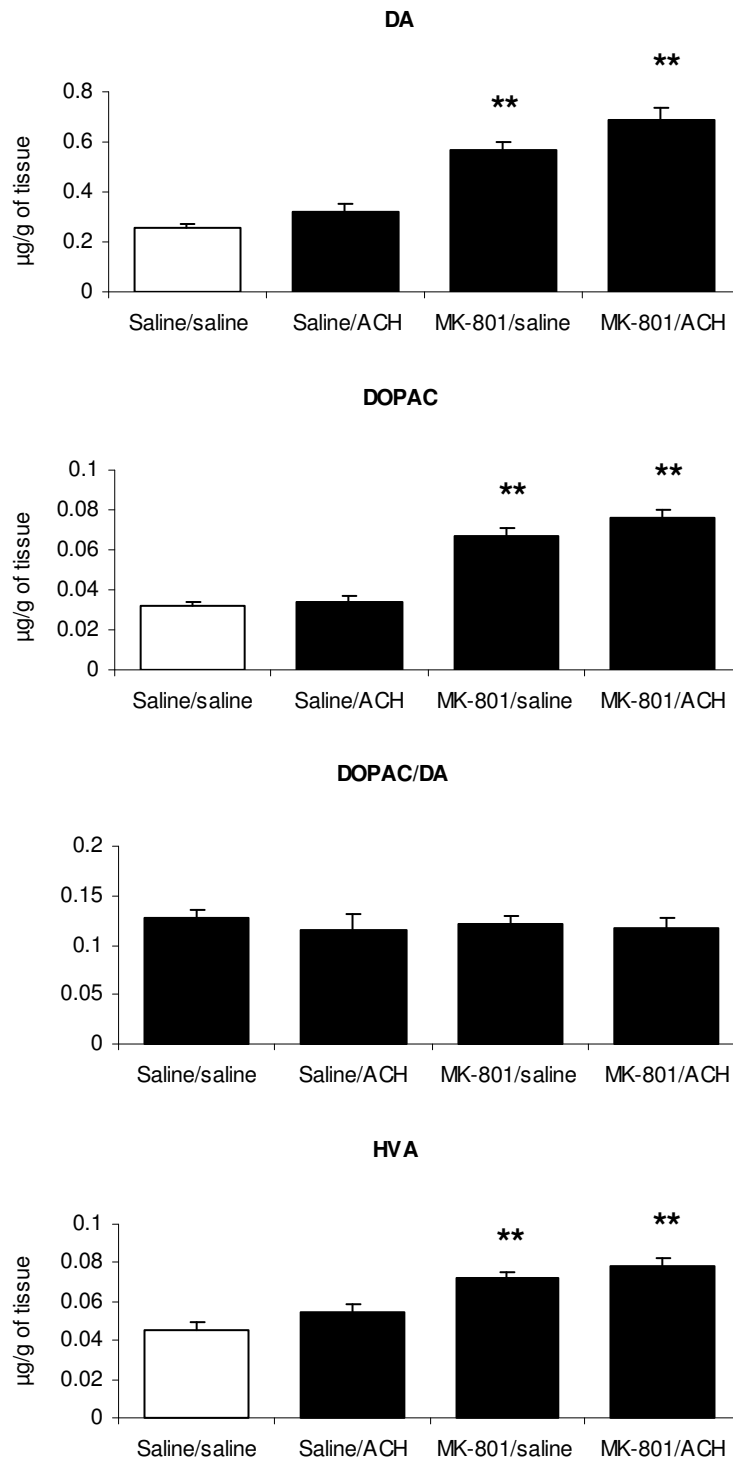


Figure 4



X. Referencias bibliográficas

- ♦ Abe K., Yamaguchi S., Sugiyama M., y Saito H. 1999. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long-term potentiation in the rat dentate gyrus "in vivo". *Brit. J. Pharmacol.* 127: 1805-1810.
- ♦ Al-Khatib, J. *et al.* 2001. Role of dopaminergic system in core part of nucleus accumbens in hyperlocomotion and rearing induced by MK-801 in rats: A behavioral and in vivo microdialysis study. *Jpn. J. Pharmacol.* 87: 277-287.
- ♦ Andiné, P., Widermark N., Axelsson R., Nyberg G., Olofsson O., Martensson E., y Sandberg M. 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1393-1408.
- ♦ Aragon C., Rogan F., y Amit Z. 1992. Ethanol metabolism in rat brain homogenates by catalase H₂O₂ system. *Biochem Pharmacol.* 44:93-98.
- ♦ Bannister P. y Losowsky MS. 1986. Cell receptors and ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 6: 50S-54S.
- ♦ Basalingappa L., Sahebarao P. 1993. Role of gangliosides in behavioural and biochemical actions of alcohol: cell membrane structure and function. *Alcohol Clin Exp Res.* 17: 329-339.

- ♦ Blanchard B., Steindorf S., Wang S., y Glik S. 1993. Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17: 968-973.
- ♦ Blitzer R., Gli O., y Landau E. 1990. Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol. *Brain Res.* 537: 203-208.
- ♦ Brailowsky S. 1995. Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Colección, La ciencia desde México. FCE-SEP-CONACYT. México D.F. 130pp.
- ♦ Brailowsky S., y García O. 1999. Ethanol, GABA and Epilepsy. *Arch Med Res.* 30: 3-9.
- ♦ Brown Z., Amit Z., y Rockman GE. 1979. Intracerebroventricular self-administration of acetaldehyde, but not ethanol, in naive, laboratory rats. *Psychopharmacol.* 64: 271-276.
- ♦ Bruijnzeel AW., Repetto M., y Gold MS. 2004. Neurobiological mechanisms in addictive and psychiatric disorders. *Psychiatr Clin N Am.* 27: 661-674.
- ♦ Budygin E., Philips P., Robinson D., Kennedy A., Gainetdinov R., y Wightman M. 2001. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 27-34.

- ♦ Carlsson M., y Carlsson A. 1990. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia- implications for schizophrenia and parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 13: 272-276.
- ♦ Carlsson A., Walters N., Holm-Waters S., Tedrof F., Nilsson M. y Carlsson M. 2001. Interactions between monoamines, glutamate and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 41: 237-260.
- ♦ Charness ME., Simon RP. y Greenberg DA. 1989. Ethanol and the nervous system. *N Eng J Med.* 7: 442-454.
- ♦ Chuck, T., McLaughlin P., Arizzi-LaFrance M., Samone J., y Correa M. 2006. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci.* 79: 154-161.
- ♦ Contreras C., Marván M., Mexicano G., y Dorantes M. 1988. Neurofarmacología del etanol. En: Velasco Fernández Rafael (Editor). *Alcoholismo. Visión integral.* Trillas. México D.F. 129-147 págs.
- ♦ Cook, C., Newman J., Winfree J., y Beardsley P. 2004. Modulation of the locomotor activating effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK801 by dopamine D2/3 receptor agonists in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77: 309-318.
- ♦ Crabbe J., Jonson N., Gray D., Kosobud A., y Young E. 1982. Biphasic effects of ethanol on open-field activity: sensitivity and

- tolerance in C57/6N and DBA/2N mice. *J. Comp. Physiol Psychol.* 96: 440-451.
- ♦ Correa M., Arizzi M., Betz A., Mingote S., y Salamone. 2003. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res. Bull.* 62: 197-202.
 - ♦ Correa M., Sanchis-Segura C., y Aragon G. 2001. Brain catalase activity is highly correlated with ethanol-induced locomotor activity in mice. *Physiol. Behav.* 73: 641-647.
 - ♦ Dahchour A., Hoffman A., Deitrich R y De Witte P. 2000. Effects of ethanol on extracellular amino acids levels in high- and low- alcohol sensitive rats: a microdialysis study. *Alcohol and alcoholism.* 35(6): 548-553.
 - ♦ Dai, H., Gebhardt K., y Carey R. 1995. Time course effects of MK-801: the relationship between brain neurochemistry and behavior. *Brain Res. Bull.* 36: 175-180.
 - ♦ Dar M., y Wooles W. 1984. The effect of acute ethanol on dopamine metabolism and other neurotransmitters in the hypothalamus and the corpus striatum of mice. *J. Neural Transm.* 60: 283-294.
 - ♦ Diamond J. y Gordon SA. 1997. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev.* 77: 1-77.
 - ♦ Deitrich RA. 1993. Selective breeding for initial sensitivity to ethanol. *Behaviour Genetics.* 23: 153-162.

- ♦ Duritz G. y Truitt B. 1966. Importance of acetaldehyde in the action of ethanol on brain norepinephrine and 5-hydroxytryptamine. *Biochem. Pharmacol.* 15: 711-721.
- ♦ Fadda F., Argiolas, A., Melis M., Serra G., y Gessa G. 1980. Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* 27: 979-986.
- ♦ Foddaí, M., Dosia G., Spiga S., y Diana M. 2004. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology.* 29: 530-536.
- ♦ Franco-Pérez, J., Padilla M., y C. Paz. 2006. Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats. *Behav. Brain Res.* 174: 86-92.
- ♦ Giovine A., Renis M., y Bertolino A. 1976. In vivo and in vitro studies on the effect of tetrahydropapoveroline and salsolinol on COMT and MAO activity in rat brain. *Pharmacology.* 14: 86-94.
- ♦ Grace A. 1991. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience.* 41: 1-4.
- ♦ Goosens K. y Maren S. 2002. Long term potentiation as a substrate for memory: evidence from studies of amygdaloid plasticity and pavlovian fear conditioning. *Hippocampus.* 12: 592-599.

- ♦ Hamby- Mason R., Chen J, Schenker S., Pérez A., y Henderson G. 1997. Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 21: 1063-1072.
- ♦ Hatake K., Taniguichi T., Ouchi H., Sakaki N., Hishida S., y Ijiri I. 1990. Possible involvement of kinins in cardiovascular changes after alcohol intake. *Pharmacol. Biochem Behav.* 24: 91-99.
- ♦ Hansson T., Tindberg N., Ingleman M., y Kohles C. 1990. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 34:451-463.
- ♦ Heap L., Ward R., Abiaka C., Dexter D., Lawor M., Pratt O., Thomson A., Shaw K., y Peters J. 1995. The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem. Pharmacol.* 50: 263-270.
- ♦ Heidbreder C., y De Witte P. 1993. Ethanol differentially affects extracellular monoamines and GABA in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 477-481.
- ♦ Heikkila R., Cohen G., y Dembiel D. 1971. Tetrahydroisoquinoline alkaloids : uptake by rat brain homogenates and inhibition of catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179: 250-258.
- ♦ Hobbs W., Rall T. y Verdoorn T. 1996. Hypnotics and sedatives; ethanol. En Hardman JG., Limbrid LE., Molinoff PB. Y Ruddon RW (editores). *Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics.* 9th edition. New York. Mc Grow Hill. Págs. 361-577.

- ♦ Holtzman S., y Scheneider F. 1974. Comparison of acetaldehyde and ethanol: depression in motor activity in mice. *Life Sci.* 14: 1243-1250.
- ♦ Hunt WA. 1996. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain- A review. *Alcohol.* 13: 147-151.
- ♦ Imperato A., Bacchi S., y Angelucci L. 1990. NMDA receptors and in vivo release in the nucleus accumbens and caudatus. *Eur. J. Pharmacol.* 187: 555-562.
- ♦ Irifune M., Shimizu T., Nomoto M, y Fukuda T. 1995. Involvement of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 291-296.
- ♦ Jamal M., Ameno K., Kumihashi M., Ameno S., Kubota T., Wang W., y Ijiri J. 2003^a. Microdialysis for the determination of acetaldehyde and ethanol concentrations in the striatum of freely moving rats. *J Chromatog.* 798. 155-158.
- ♦ Jamal M., Ameno K., Kubota T., Ameno S., Zhang X., Kumihashi M., y Ijiri J. 2003^b. In vivo formation of salsolinol induced by high acetaldehyde concentration in rat striatum employing microdialysis. *Alcohol Alcohol.* 38: 197-201.
- ♦ Kandel E., y Siegelbaum S. 2000. Integración sináptica. En: Kandel E., Schwartz J. Jessell T. (editores). *Principios de Neurociencia.* Cuarta edición. Mc Graw Hill/Interamericana. España. 207-228.

- ♦ Kavaliers M., y Perrot-Sinal T. 1996. **Measuring activity in invertebrates and lower vertebrates** En: Ossenkop Klaus- Peter, Kavaliers M., Sanberg P. (editors). . **Measuring movement and locomotion: from invertebrates to humans.** Chapman and Hall. EUA y Canadá. Págs 13-31.
- ♦ Keilin D., y Martree E. 1945. **Propeties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohol.** *Biochem J.* 39: n293-301.
- ♦ Kiiänmaa K., Nurmi M., Nykänen I., y Sinclair J. 1995. **Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 29-34.
- ♦ Koek W., Woods J., y Winger G. 1988. **MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys.** *J. Pharmacol. Ther.* 245: 969-974.
- ♦ Lapin I., y Rogawski M. 1995. **Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists and catecholamine depleting agents on the locomotor stimulation induced by dizocilpine in mice.** *Behav. Brain Res.* 70: 145-151.
- ♦ Lieber C. 1997. **Cytochrome p450 E1: Its physiological and pathological role.** *Physiol. Rev.* 77: 517-544.
- ♦ Liljequist S., Ossowska K. Grabowska-Andén M., y Andén NE. 1991. **Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801 on**

locomotor activity on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *Eur. J. Pharmacol.* 195: 55-61.

- ♦ Little H. 2000. Alcohol as a stimulant drug. *Addiction.* 95: 1751-1753.
- ♦ Lovinger D., White G. y Weight F. 1989. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 243: 1721-1724.
- ♦ Maldonado-Irizarry C. y Kelley A. 1994. Differential behavioral effects following microinjection of an NMDA receptor antagonist into nucleus accumbens subregions. *Psychopharmacol.* 116:65-68.
- ♦ Martínez S., Vanglenova J, Sabreia J., Martínez M., Farres J., y Pares X. 2001. Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. *Eur J Biochem.* 268: 5045-5056.
- ♦ Matsumoto N., Hanakawa T., Maki S., Graybiel A., y Kimura M. 1999. Role of [corrected] nigrostriatal dopamine system in learning to perform sequential motor tasks in a predictive manner. *J. Neurophysiol.* 83: 978-998.
- ♦ Mele A., Catellano C., Felici A., Cabib S., Caccia S., y Oliverio A. 1996. Dopamine-N-methyl-D-aspartate interactions in the modulation of locomotor activity and memory consolidation. *Eur. J. Pharmacol.* 308: 1-12.
- ♦ Mink J., y Thach W. 1993. Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol* 3: 950-957.

- ♦ Molloy A., y Waddington J. 1984. Dopaminergic behavior stereospecific promoted by the D1 agonist SKF 38393 and selectively blocked by the D1 antagonist SCH 23390. *Psychopharmacol.* 82: 409-410.
- ♦ Moore H., y Grace A. 2002. A role for electronic coupling in the striatum in the expresión of dopamine receptor-mediated stereotypies. *Neuropsychopharmacol.* 27: 980-992.
- ♦ Morris R., Anderson G., y Burry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long term potentiation by an N-metyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319: 774-776.
- ♦ Murase S., Mathé J., Grenhoff J., y Svensson T. 1993. Effects of dizocilpine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: Differential actions on firing pattern related to anatomical localization. *J. Neural Transm.* 91: 13-25.
- ♦ Myers W., Marzuki S., Myers R., y Singer G. 1984. Alteration of alcohol drinking in the rat by peripherally self-administered acetaldehyde. *Alcohol.* 1:229-236.
- ♦ Nevo I. y Hamon M. 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int.* 26: 305-336.
- ♦ Ossenkop K., y Kavaliers M. 1996. Measuring spontaneous locomotor activity in small mammals. En: Ossenkop Klaus- Peter, Kavaliers M., Sanberg P. (editors). . *Measuring movement and locomotion: from*

- invertebrates to humans. Chapman and Hall. EUA y Canadá. Págs 33-59.
- ♦ Pallares M., Nadal R., y Ferre N. 1991. Alcohol y conducta animal. Avances Psicol. Clin Latinoam. 9: 29-33
 - ♦ Pearson K., Gordon J. 2000. Locomoción. En: Kandel E., Schwartz J. and Jessell T. (editores) Principios de Neurociencia. McGraw-Hill-Interamericana. Cuarta edición. España. Págs. 737-755.
 - ♦ Qing-Shan, . *et al.* 1997. Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. Brain Res. 765: 149-158.
 - ♦ Quertemont E., y De Witte P. 2001. Conditioned stimulus preference alter acetaldehyde but not ethanol injections. Pharmacol. Biochem. Behav. 68: 449-454.
 - ♦ Quertemont E., Tambour S., Bernaerts P., Zimatkin S., y Tirelli E. 2004. Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. Psychopharmacology. 177: 84-92.
 - ♦ Quertemont, E., Tambour, S., y Tirelli, E. 2005^a. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. Prog. Neurobiol. 75: 247-274.
 - ♦ Quertemont E., Grant K., Correa M., Arizzi M., Salamone J. Tambour S., Aragon C., McBride W., Rodd Z., Goldstein A., Zaffaroni A., Li

- T., Pisano M. y Diana M. 2005^b. The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29: 221-234.
- ♦ Robledo, P., W. Kaneko & C. Ehlers. 1991. Combined effects of ethanol and MK-801 on locomotor activity in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 513-516.
 - ♦ Rodd Z., Goldstein A., Zaffaroni A., y Li T. 2004. Contrasting the reinforcing actions of acetaldehyde and ethanol within the ventral tegmental area (VTA) of alcohol-preferring (p) rats. *Alcohol. Clin Exp. Res.* 28(suppl): 196A.
 - ♦ Rodd-Hendriks Z., Melendez R., Zaffaroni A., Goldstein A., McBride W., y Lu T. 2002. The reinforcing effects of acetaldehyde in the posterior ventral tegmental area of alcohol-preferring rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72: 55-64.
 - ♦ Samson HH. y Harris RA. 1992. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends in Pharmacol Sci.* 13: 206-211.
 - ♦ Sanchis-Segura C., Miguel M., Correa M., y Aragón C. 1999. Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: is there a functional link? *Psychopharmacology.* 144:83-89.
 - ♦ Schuckit MA., Helzer JE., Cottler, LB., Cowley T., Nathan PE., Thorpy M. 2004. Trastornos relacionados con el alcohol. Frances A. (Presidente, Comité elaborador del DSM-IV). *DSM-IV-TR. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.* MASON. Barcelona, España. 1049 pp.

- ♦ Shridhar N., Willings D., Dalía A., Wallace L., y Utresky N. Role of dopaminergic mechanisms in the stimulatory effects of MK-801 Injected into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 565-573.
- ♦ Sjoquist, B., Eriksson A. y Winblad B. 1982. Brain salsolinol levels in alcoholism. *Lancet.* 1: 675-676.
- ♦ Smith B., Amit Z., y Splawinsky J. 1984. Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol.* 1: 193-195.
- ♦ Smyth H., Carpenter C., y Weil C. 1951. Range-finding toxicity data: List IV. *Arc Ind Hyg Occup Med.* 4: 119-122.
- ♦ Sudak PD., Schwartz RD., Skolnick P. y Steven PM. 1986. Ethanol stimulates γ -aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 83: 4071-4075.
- ♦ Svensson, A., E. Pileblad & M. Carlsson. 1991. A comparison between the non-competitive NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) and the competitive NMDA antagonist D-CPPene with regard to dopamine turnover and locomotor-stimulatory properties in mice. *J. Neural Trans. Gen. Sect.* 85: 117-129.
- ♦ Tabakoff B., Anderson R., y Ritzmann R. 1976. Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem Pharmacol.* 25: 1305-1309.
- ♦ Tabakoff B., y Hoffman P. 1996. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron.* 16: 909-912.

- ♦ Tambour, S., Didone V., Tirelli E., y Quertemont E. 2006. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* 172: 145-154.
- ♦ Thadani V., y Truitt B. 1977. Effect of acute ethanol or acetaldehyde administration on the uptake, release, metabolism and turnover rate of norepinefrine in rat brain. *Biochem Pharmacol.* 26: 1147-1150.
- ♦ Weiner C., y Collins M. 1978. Tetrahydroisoquinolines derived from catecholamines or DOPA: effects on brain tyrosine hydroxylase activity. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2699-2703.
- ♦ Ward R., Colantuoni C., Dehchour A., Quertemont E., y De Witte P. 1997. Acetaldehyde-induced changes in the monoamines and aminoacid extracellular microdialisate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacol.* 36:225-232.
- ♦ Warner M., y Gustafsson J. 1994. Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *PNAS.* 91:1019-1023.
- ♦ Watanabe A., Kobayashi M., Hobar M., Nakatsukasa H., Nagashima H., y Fujimoto A. 1985. A report of unusually high blood ethanol and acetaldehyde levels in two surviving patients. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 9: 14-16.
- ♦ Willins D., Narayanan S., Wallace L., y Uretsky N. 1993. The role of dopamine and AMPA/Kainate Receptors in the nucleus accumbens in

the hypermotility response to MK-801. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 881-887.

- ♦ Zhang J., Chiodo L., y Freeman A. 1992. Electrophysiological effects of MK-801 on rat nigrostriatal and mesoaccumbal dopaminergic neurons. *Brain Res.* 590: 153-163.
- ♦ Zimatkin S. 1991. Histochemical study of aldehyde deshidrogenase in the rat CNS. *J Neurochem.* 56: 1-11.

Mónica Padilla-de la Torre¹, Javier Franco-Pérez¹, Abel Santamaría², Sonia Galvan³, Edith González¹ and Carlos Paz¹@

¹*Departamento de Neurofisiología*

²*Laboratorio de Aminoácidos Excitadores*

³*Departamento de Neuroquímica*

*Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A.
México D.F. 14269, México.*

@ Corresponding author:

Dr. Carlos Paz,

Departamento de Neurofisiología

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S.

Insurgentes Sur No. 3877, Col. La Fama, C.P. 14269 México D.F., México

Tel: +52 55 5606 38 22

Fax: +52 55 5424 08 08

E-mail: pztres@servidor.unam.mx

Keywords: Acetaldehyde, MK-801, locomotion, dopamine metabolism.

ABSTRACT

Alterations in motor activity related to dopamine changes in some brain regions have been described as consequences of those modifications produced by systemic administration of MK-801 (a non-competitive NMDA receptor antagonist) in rats. Acetaldehyde (ACH), the main metabolite of ethanol, has been implicated in different alterations in the Central Nervous System after ethanol ingestion. ACH might exert some control on dopaminergic transmission through the formation of other compounds with dopamine, which eventually may modify dopamine content and its metabolism. In order to evaluate such hypothesis, in the present study we used Wistar rats to evaluate the effect of ACH on locomotor alterations and dopamine metabolism changes induced by MK-801. Our results show that MK-801-treated group had a significant increase in the locomotor activity. In contrast, we did not find significant differences in locomotion test after ACH administration. However, the group administered with both drugs showed a significant decrease in locomotor activity compared with MK-801 alone. The neurochemical analysis showed an increase in dopamine content in the striatum and frontal cortex after MK-801 administration though; the increase was reverted by 200 mg/ kg of ACH. In conclusion, these results indicate that ACH can be producing an antagonic-like effect on locomotor alterations and dopamine content changes induced by MK-801, thus modulating the MK-801-induced hyperlocomotion by interfering with dopamine metabolism.

INTRODUCTION

The non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist dizocilpine (MK-801), produces hyperlocomotion, stereotyped behavior and ataxia in rodents^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}. The MK-801-induced locomotor hyperactivity can be abolished or largely attenuated by depletion of endogenous dopamine (DA) after systemic administration of DA receptor antagonists⁸, or applied directly into the nucleus accumbens (NAc)^{9, 3}. These findings indicate that the major behavioral effects of MK-801 are DA-dependent. In addition, MK-801 has been shown to produce both, an increase in DA metabolism and content in some specific brain regions^{10, 2, 5}. Furthermore, there are some studies that have reported increase in the firing rate of mesoaccumbal and ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons^{11, 12}. Therefore, it has been hypothesized that the MK-801 has an active role of DA, particularly in some mesolimbic structures^{3, 13}.

On the other hand, there is strong evidence suggesting that some effects of ethanol on the brain could be due to ACH, its main metabolite. ACH has been proposed to be responsible of some neuropharmacological actions after ethanol ingestion¹⁴, such as excessive neuronal firing¹⁵, changes in some central neurotransmission systems^{16, 17} and in some neurophysiologic disturbances^{18, 19}. Such hypothesis has been sustained regarding that ACH is able to cross the brain blood-barrier after a single systemic dose administration (220 mg/kg)¹⁷.

Several locomotion studies have reported decreased motor patterns after the systemic administration of high doses of ACH^{20, 21}. Nonetheless, other reports have shown different results when the administration has been done directly in the cerebral ventricles where ACH displays locomotor stimulant properties even at low doses²². There are only few studies regarding the effects of ACH on the content of neurotransmitters. For instance, it has been demonstrated that the intraperitoneal

(ip) administration of ACH is able to decrease DA and DOPAC^{16, 17} concentrations in the brain.

Interestingly, there are no reports in literature describing the effects of ACH on the locomotion patterns and DA metabolism induced by MK-801, and this is surprising since some of the effects of ACH in the brain seem to be antagonistic to those of MK-801. Therefore, the present study was designed to provide information about the possible modulatory effect of the main metabolite of ethanol, ACH, on the effect of MK-801 and its relation with DA metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals and drugs administration. Adult male Wistar rats (250-300 g) were used throughout the study. Animals were housed in acrylic cages and provided with water and food *ad libitum*. The room was maintained under constant conditions of temperature ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humidity ($50 \pm 10\%$), and light (12:12 light/dark cycles). All animals were treated with suitable measures to minimize pain or discomfort according to the regulations specified by the Animal Care and Use Committee of our Institution, as well as following the standards of the National Institutes of Health of Mexico.

Saline solution was used as vehicle for administration of MK-801 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and ACH (Fluka Chemie, Steinheim, Switzerland). Drug solutions were daily prepared and ip administered as 1 ml/300 mg of body weight. Animals were divided into four experimental groups. All groups received two injections separated by a 20-minutes period: (1) saline/saline, (2) saline/ACH (200 mg/kg), (3) MK-801 (0.3 mg/kg)/saline, (4) MK-801 (0.3 mg/kg)/ACH (200 mg/kg). We administered MK-801 first due that its behavioral effects have shown 20 minutes after systemic administration whereas, ACH show its behavioral effects immediately

Locomotion test. For the behavioral assessment, 11 animals per experimental group were used. All experiments were run between 8:00 am and 3:00 pm under standard conditions of temperature, lighting and noise. Motor activity (including horizontal and ambulatory activities), was monitored in a custom-made transparent Plexiglass box (45 x 45 x 25) inside an Optovarimex (Columbus instrument, Columbus, OH, USA) under light illumination (200 Lux). The number of light beam interruptions due to animal movements was automatically recorded and expressed as activity counts. Rats were habituated to the environmental conditions of the

room where the locomotion tests were performed since 5 days before the trial day. Routinely, animals were individually placed on the center of the box and allowed for a free navigation in the clear Plexiglass box over a 30 min period for habituation and 1 hr for locomotion test. The locomotion assessment started immediately after the first drug or vehicle administration. The counts of horizontal, ambulatory and vertical activity were recorded every 5 minutes during 1 hour. A brief interruption was made to the second drug or saline administration.

Dopamine quantification. For the neurochemical assessments, additional groups of animals (a minimum of 14 animals per group) were used under the same experimental conditions, but in an independent manner of those employed for behavioral tests. The neurochemical analysis was performed according to the following protocol. Rats were killed by decapitation and the striatum and frontal cortex were dissected out according to the technique described by Glowinsky and Iversen²³. Tissue samples were immediately placed on ice and sonicated in 1000 μ l of perchloric acid 0.4N with 0.1 % (w/v) sodium metabisulphite, followed by 10 min of centrifugation at 18,000 g (4°C). Supernatants were kept frozen at -70°C until the chromatographic analysis was performed.

DA, DOPAC (3,4- dihydroxyphenilacetic acid) and (homovanillic acid) HVA were analyzed by high resolution liquid chromatography with an electrochemical detector as has been previously described²⁴. A Perkin-Elmer LC-250 liquid chromatograph with a Bass electrochemical detector was used. Peaks were integrated with TotalChrom software developed by Perkin-Elmer. We used a 100 mm x 4.8 mm Alltech adsorbosphere catecholamine analytical column with 3 μ m of particle size. The mobile phase consisted of an aqueous potassium phosphate buffer solution (0.1 M, pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulphate, EDTA 0.1 mM and 15 %

(v/v) methanol. Flow rate was 1.2 ml/min. Potential was fixed at 0.80 V against an Ag/AgCl reference electrode.

Statistical analysis. For behavioral data, we used two-way repeated measures ANOVA. Subsequent comparisons within conditions were made using Tukey's test. The neurochemical data were analyzed using one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test.

RESULTS

Locomotor activity. We did not find significant differences in horizontal activity when the saline/ACH group was compared with saline/saline group. In contrast, the horizontal activity was significantly increased in the MK-801/saline group, and this increase was recorded from minute 20 and up to the end of the locomotion test. Interestingly, the group co-administered with MK-801/ACH showed a significant decrease in horizontal activity in comparison with MK-801/saline group, ($F(3,527)=29.9$ $p<0.001$), (Fig. 1A). When the total motor horizontal activity, was analyzed, we found that MK-801 produced an increase in this parameter that was diminished by the co-administration of ACH ($F(3,43)=29.4$ $p<0.001$), (Fig. 1B).

Figure 2 shows the effects of MK-801 and ACH on ambulatory activity. No significant changes were observed on ambulatory activity after saline/ACH administration. In contrast, this marker was significantly increased in the MK-801/saline group, while the co-administration of MK-801 with ACH significantly reduced the effect of MK-801 alone ($F(3,527)=32.8$ $p<0.001$), (Fig. 2A). The analysis of total ambulatory activity demonstrated that injection of MK-801 increases this activity, whereas ACH can moderate the MK-801-induced hyperlocomotion ($F(3,43)=28.9$ $p<0.001$), (Fig. 2B).

Dopamine content. We found that the striatal DA content decreased after saline/ACH administration. In contrast, MK-801 caused a significant increase of this neurotransmitter, and such effect can be reverted by mean of the co-administration of MK-801 and ACH ($F(3,55)=23.4$ $p<0.001$) (Fig. 3). The DA metabolites content (DOPAC and HVA) showed similar changes: decreased levels after saline/ACH injection, increased levels in the MK-801/saline group and preservation of basal levels after MK-801/ACH administration ($F(3,55)=37.6$

$p < 0.001$ and $F(3,55) = 23.7$ $p < 0.001$, respectively). The DOPAC/DA ratio was only altered in the MK-801/saline group, ($F(3,55) = 6.9$ $p < 0.05$) (Fig. 3).

Figure 4 shows frontal cortex DA and metabolites levels after MK-801 and ACH treatment. Interestingly, we did not find any significant difference after the saline/ACH injection. In this brain region, the DA content increased in both MK-801/saline and MK-801/ACH groups ($F(3,55) = 38.2$ $p < 0.001$), and the same effect was observed on DOPAC and HVA content in both MK-801/saline and MK-801/ACH groups ($F(3,55) = 44.5$ $p < 0.001$ and $F(3,55) = 15.2$ $p < 0.001$, respectively). Finally, the DOPAC/DA ratio did not suffer significant changes in the frontal cortex.

DISCUSSION

Results of this study show that ACH is able to revert or attenuate the effects of MK-801 on the locomotive pattern and DA concentrations in the rat striatum, but not in frontal cortex. Although we found that ACH slightly decreased the basal kinetic pattern of activity, there are several reports in literature showing an opposed effect. We attributed such discrepancy to differences in doses and in the administration route used. Since it is known that ethanol exerts a biphasic effect depending of its dosages, it is likely that its metabolite ACH might have the same effect. Therefore, the rationale for the use of a high dose of ACH in our experiments was to evoke the depressive effect of this drug on locomotion, as it occurs after an acute exposure of high doses of ethanol. In further support to these considerations, it is known that cyanamide administration, an aldehyde dehydrogenase inhibitor, reduces the locomotor activity after ethanol administration²⁵. This suggests that elevation of blood and brain ACH concentrations raise the locomotor depressive effects of ethanol. In regard to the lack of effect of ACH on the actions of MK-801 in frontal cortex, we do not have an explanation, although the proportion of DA neurons along the striatum, in comparison with that of frontal cortex is larger and this fact could account for a possible explanation of the differential effects observed.

ACH, a molecule exhibiting more toxic features than its precursor ethanol, has been suggested to be responsible of many of the pharmacological and behavioral effects of ethanol, including locomotive, hypnotic, aversive, reinforcement and memory effects^{14, 26}. As many sedative or depressant drugs, ethanol has a complex biphasic effect across time and dose, and has been shown to possess an important psychomotor stimulant effect at relatively low doses^{21, 22}. Nonetheless, higher doses of ethanol produce effects that are associated with sedation and are,

in general terms, reported to suppress or impair motor activity²⁷. Therefore, ACH seems to be mainly a depressive drug when is systemically administered, whereas it can act as a stimulant when is administered directly in the brain^{20, 21}. Thus, it has been demonstrated that the trend of its effect is in direct relation with the administered doses. In the present study, we employed a pharmacological dose of ACH, rather than a physiological dose. We administered a high single dose of ACH (200 mg/kg), which is similar to the one previously reported to be effective to cross the blood brain barrier (220 mg/kg)¹⁷. In pharmacokinetic studies, although of consideration is the fact that even lower doses of systemic ACH (20-100 mg/ kg) can be detected in the brain, only 10 minutes after its administration¹⁶.

In agreement with several previous reports, we confirmed that the systemic administration of MK-801 produces an enhancement in locomotor activity^{2, 6, 28}. Indeed, the hyperlocomotion induced by MK-801 has been accepted as a model of psychosis, since its effects are very similar, at least in some symptomatic aspects⁴. The most accepted explanation regarding its effect on locomotion is that of an inhibition of NMDA receptors which produces a significant increase in DA contents in some DA-enriched mesolimbic areas, such as NAc, VTA and the striatum. Consequently, these neurochemical changes have been attributed to an enhancement of dopaminergic activity in mesolimbic neurons^{11, 12}.

On the other hand, DA has been assessed after ACH administration, and previous reports have established that systemic ACH injection reduce both release¹⁶ and DA content¹⁷, and enhance their firing pattern of DA neurones¹⁵. There is a controversial results about DA content after ethanol administration, some studies have shown to increase the DA metabolism^{29, 30, 31}, whereas at low doses it decreases³², or even has no effect on DA levels³³. Furthermore, it has been shown that ethanol alters the majority of the neurotransmission and neuromodulatory

systems^{34, 35} and these changes are both dose and time-dependent. Examples are the depletion of DA levels³² and neurotransmission³⁶ after ethanol administration. Taking into account that ethanol is mostly converted into ACH, at least part of these changes is assumed to be due to ACH. There are also several studies showing that MK-801 affects locomotion through DA alterations^{1, 8}. However, very few studies exist regarding the effects of ACH on these markers, although, ACH and MK-801 seem to affect the same metabolic pathways. Interestingly DA, through a non enzymatic ring cyclization with ACH, is able to form the neuroactive alkaloid salsolinol (SAL). This compound has been detected in human brain³⁷ and more actually in the striatum and nucleus accumbens of free-moving rats^{38, 39}. Classic studies demonstrated that SAL produces changes on catecholamine metabolism which include release of stored catecholamines, inhibition of catecholamine reuptake and inhibition of enzymes like monoamine-oxidase, catechol-O-methyltransferase and tyrosine-hydroxylase^{40, 41, 42}. We observed that ACH revert the increase of DA content induced by MK-801 in striatum. Therefore, we assume that some portion of free DA is used to form SAL, and this compound could, in turn, produce inhibition on some key enzymes for DA metabolism, thereby leading to decreased DA levels, and so, counteracting for the effects of MK-801. However, in order to confirm this hypothesis, further studies will be needed to determine the precise participation of SAL in the effect of ACH on hyperlocomotion induced by MK-801.

In summary, our results show that an acute ACH administration to rats reduces the hyperlocomotion induced by MK-801, also decreasing the DA metabolism in the striatum, an enriched-DA region. Of final consideration, while many reports have demonstrated that ethanol inhibits the NMDA receptor^{35, 43}, only few show effects of ACH itself in processes mediated by these receptors, such as long term

potentiation in hippocampus¹⁸. Interestingly, our results correlate well with other studies demonstrating that high doses of ethanol can decrease the MK-801-induced locomotor activity, confirming that there is an interaction between the actions of ethanol and MK-801⁴⁴, which is likely to be similar to the one we found in this study with ACH. Our findings support the hypothesis that ACH modulates the MK-801-induced behavioral and neurochemical alterations through specific modifications in DA metabolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the scholarship number 182506 granted to Mónica Padilla-de la Torre from CONACyT-México.

REFERENCES

1. Liljequist, S. *et al.* 1991. Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *European J. Pharmacol.* 195: 55-61.
2. Dai, H., K. Gebhardt & R. Carey. 1995. Time course effects of MK-801: the relationship between brain neurochemistry and behavior. *Brain Res. Bull.* 36: 175-180.
3. Shridhar, N. *et al.* 1996. Role of dopaminergic mechanisms in the stimulatory effects of MK-801 injected into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 565-573.
4. Andiné, P. *et al.* 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 1393-1408.
5. Al-Khatib, I. *et al.* 2001. Role of dopaminergic system in core part of nucleus accumbens in hyperlocomotion and rearing induced by MK-801 in rats: A behavioral and in vivo microdialysis study. *Jpn. J. Pharmacol.* 87: 277-287.
6. Cook, C. *et al.* 2004. Modulation of the locomotor activating effects of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK801 by dopamine D2/3 receptor agonists in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77: 309-318.
7. Mathé, J. *et al.* 1998. Non-NMDA excitatory amino acid receptors in the ventral tegmental area mediate systemic dizocilpine (MK-801) induced hyperlocomotion and dopamine release in the nucleus accumbens. *J. Neurosci. Res.* 5: 583-592.

8. Lapin, I. & M. Rogawski. 1995. Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists and catecholamine depleting agents on the locomotor stimulation induced by dizocilpine in mice. *Behav. Brain Res.* 70: 145-151.
9. Willins, D. *et al.* 1993. The role of dopamine and AMPA/kainate receptors in the nucleus accumbens in the hypermotility response to MK-801. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 881-887.
10. Svensson, A., E. Pileblad & M. Carlsson. 1991. A comparison between the non-competitive NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) and the competitive NMDA antagonist D-CPPene with regard to dopamine turnover and locomotor-stimulatory properties in mice. *J. Neural Trans. Gen. Sect.* 85: 117-129.
11. Zhang, J., L. Chiodo & A. Freeman. 1992. Electrophysiological effects of MK-801 on rat nigrostriatal and mesoaccumbal dopaminergic neurons. *Brain Res.* 590: 153-163.
12. Murase, S. *et al.* 1993. Effects of dizocilpine (MK-801) on rat midbrain dopamine cell activity: Differential actions on firing pattern related to anatomical localization. *J. Neural Transm.* 91: 13-25.
13. Qing-Shan, Y. *et al.* 1997. Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. *Brain Res.* 765: 149-158.
14. Hunt, W. 1995. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain -A review. *Alcohol.* 13: 147-151.
15. Foddai, M. *et al.* 2004. Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology.* 29: 530-536.
16. Ward, R. *et al.* 1997. Acetaldehyde-induced changes in the monoamine and amino acid extracellular microdialysate content of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 36: 225-232.

17. Heap, L. *et al.* 1995. The influence of brain acetaldehyde on oxidative status, dopamine metabolism and visual discrimination task. *Biochem. Pharmacol.* 50: 263-270.
18. Abe, K. *et al.* 1999. The ethanol metabolite acetaldehyde inhibits the induction of long-term potentiation in the rat dentate gyrus *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1805-1810.
19. Franco-Pérez, J., M. Padilla & C. Paz. 2006. Sleep and brain monoamine changes produced by acute and chronic acetaldehyde administration in rats. *Behav. Brain Res.* 174: 86-92.
20. Quertemont, E. *et al.* 2004. Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology.* 177: 84-92.
21. Tambour, S. *et al.* 2006. Locomotor effects of ethanol and acetaldehyde after peripheral and intraventricular injections in Swiss and C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* 172: 145-154.
22. Correa, M. *et al.* 2003. Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. *Brain Res. Bull.* 62: 197-202.
23. Glowinsky, J. & LL. Iversen. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of H-norepinephrine, H-dopamine, and H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-659.
24. Diggory, G.L. & W.R. Buckett. 1984. An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection. Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. *J. Pharmacol. Meth.* 11: 207-217.

25. Sanchis-Segura, C. *et al.* 1999. Cyanamide reduces brain catalase and ethanol-induced locomotor activity: is there a functional link? *Psychopharmacology*. 144:83-89.
26. Quertemont, E., Tambour, S. & Tirelli, E. 2005. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies. *Prog. Neurobiol.* 75: 247-274.
27. Chuck, T.L. *et al.* 2006. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci.* 79: 154-161.
28. Irifune, M. *et al.* 1995. Involvement of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51: 291-296.
29. Fadda, F. *et al.* 1980. Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci.* 27: 979-986.
30. Heidbreder, C. & P. De Witte. 1993. Ethanol differentially affects extracellular monoamines and GABA in the nucleus accumbens. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46: 477-481.
31. Kiiianmaa, K. *et al.* 1995. Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 29-34.
32. Blanchard, B. A. *et al.* 1993. Sex differences in ethanol-induced dopamine release in nucleus accumbens and in ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17: 968-973.

33. Dar, M. & W. Wooles. 1984. The effect of acute ethanol on dopamine metabolism and other neurotransmitters in the hypothalamus and the corpus striatum of mice. *J. Neural Transm.* 60: 283-294.
34. Nevo, I. & M. Hamon. 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem. Int.* 26: 305-336.
35. Diamond I. & A. Gordon. 1997. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77: 1-20.
36. Budygin, E. *et al.* 2001. Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 27-34.
37. Sjoquist, B., A. Eriksson & B. Winblad. 1982. Brain salsolinol levels in alcoholism. *Lancet.* 1: 675-676.
38. Jamal, M. *et al.* 2003. In vivo formation of salsolinol induced by high acetaldehyde concentration in rat striatum employing microdialysis. *Alcohol Alcohol.* 38: 197-201.
39. Jamal, M. *et al.* 2003. In vivo study of salsolinol produced by high concentration of acetaldehyde in the rat striatum and nucleus accumbens of free-moving rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27: 79S-84S.
40. Heikkila, R., G. Cohen & D. Dembiel. 1971. Tetrahydroisoquinoline alkaloids: uptake by rat brain homogenates and inhibition of catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179: 250-258.
41. Giovine, A., M. Renis & A. Bertolino. 1976. In vivo and in vitro studies on the effect of tetrahydropapaveroline and salsolinol on COMT and MAO activity in rat brain. *Pharmacology.* 14: 86-94.

42. Weiner, C.D. & M.A. Collins. 1978. Tetrahydroisoquinolines derived from catecholamines or DOPA : effects on brain tyrosine hydroxylase activity. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2699-2703.
43. Lovinger, D. M., G White, & Weight F. 1989. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 243: 1721-1724.
44. Robledo, P., W. Kaneko & C. Ehlers. 1991. Combined effects of ethanol and MK-801 on locomotor activity in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39: 513-516.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) or their co-administration on horizontal activity. A. Animals were administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH and horizontal counts were recorded every 5 minutes for 60 minutes. Results were statistically compared using two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. B. Total horizontal activity recorded after 60 minutes of locomotion test. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. Arrows indicate the administration trials.

Figure 2. Effects of ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg) or their co-administration on ambulatory activity. A. Animals were administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH and ambulatory counts were recorded every 5 minutes for 60 minutes. Results were statistically compared using two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. B. Total ambulatory activity recorded after 60 minutes of locomotion test. The results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.001$. Arrows indicate the administration trials.

Figure 3. Concentrations of DA, DOPAC and HVA, and DOPAC/DA ratio in the striatum of rats administered with saline/saline, saline/ACH (200 mg/kg), MK-801 (0.2 mg/kg)/saline or MK-801/ACH. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; *statistically different from all groups, $p < 0.05$; + statistically different from saline/ACH and MK-801/saline groups, $p < 0.001$.

Figure 4. Concentrations of DA, DOPAC and HVA, and DOPAC/DA ratio in frontal cortex of rats administered with saline/saline, saline/ACH, MK-801/saline or MK-801/ACH. Results were statistically compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test; **statistically different from saline/saline and saline/ACH groups, $p < 0.001$.

Figure 1

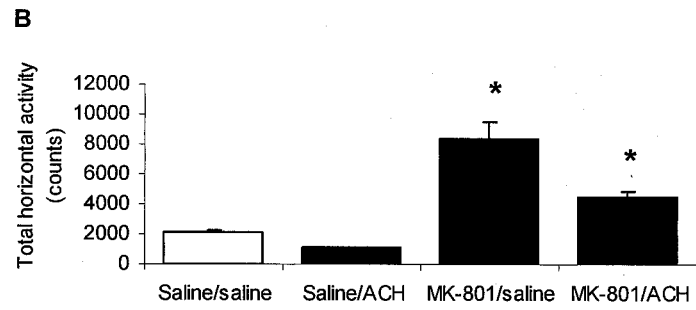
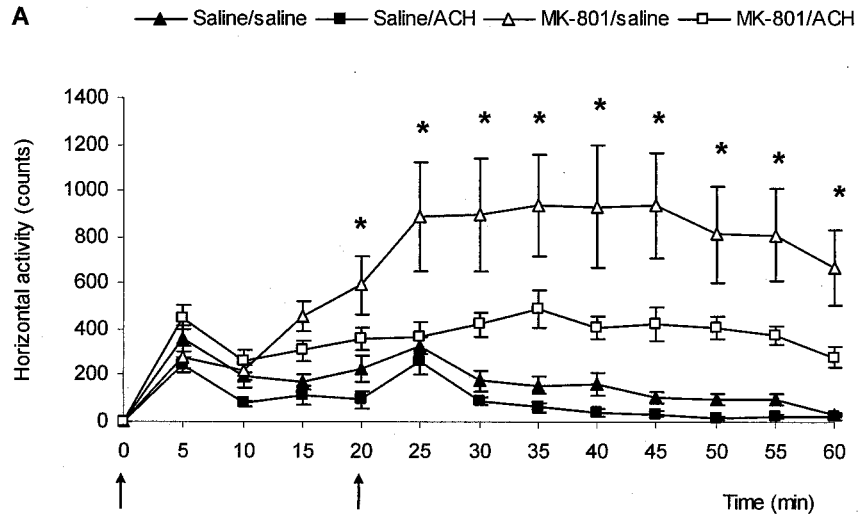
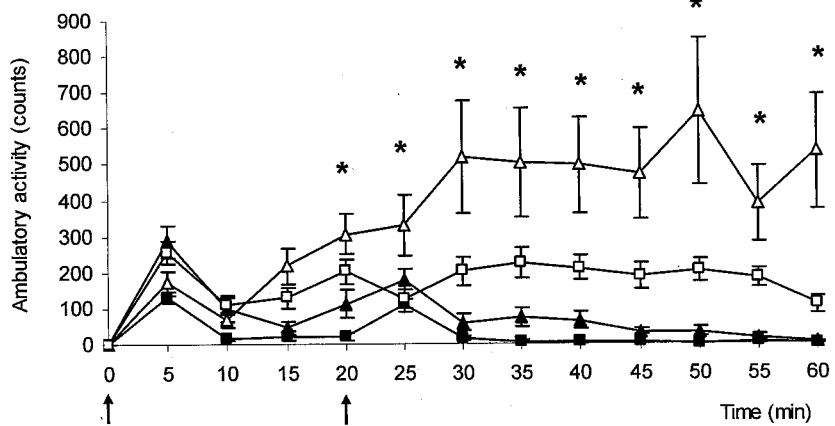


Figure 2

A \blacktriangle Saline/saline \blacksquare Saline/ACH \triangle MK-801/saline \square MK-801/ACH



B

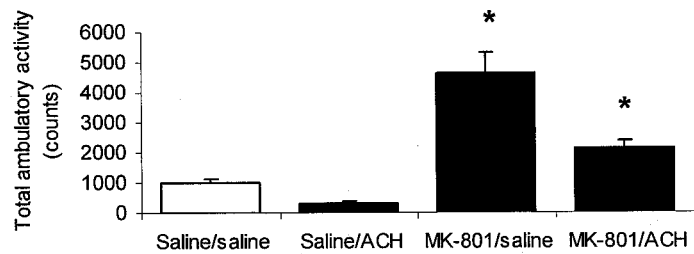


Figure 3

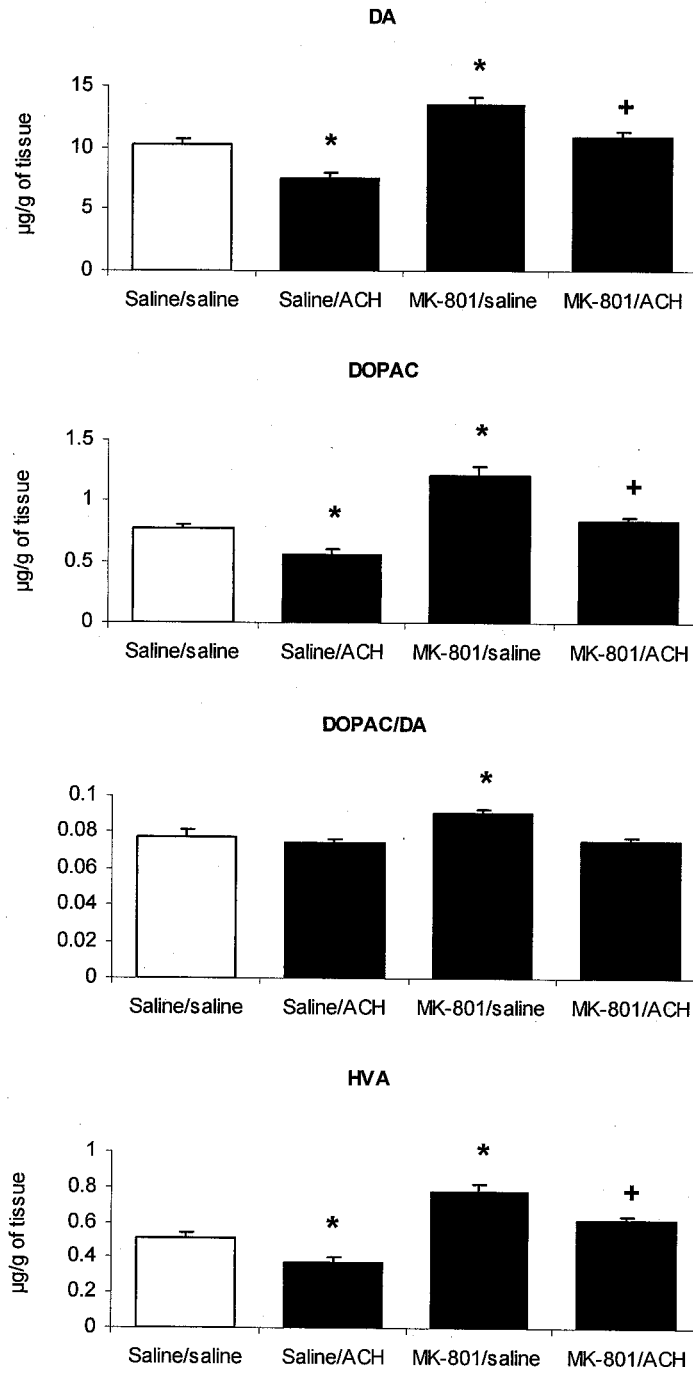


Figure 4

