



UNIVERSITAT  
JAUME·I

Grado en Psicología

Trabajo Final de Grado

---

El papel del calcio intracelular en la estimulación  
locomotora inducida por el alcohol

---

Beatriz Bejerano Cutillas

DNI: 74018904M

Tutor: Carlos Manuel González Aragón

Convocatoria: Junio de 2017



## ÍNDICE

<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EXTENDED SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
3.1. Etanol.....	5
3.1.1. Dianas citoplasmáticas.....	6
3.1.2. Acción del etanol sobre canales iónicos .....	7
3.2. Calcio.....	12
3.3. Calcio y etanol.....	13
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>14</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
5.1. Estudio 1: <i>Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin on ethanol neurobehavioral effects</i> .....	16
5.2. Estudio 2: <i>Participation of L-type calcium channels in ethanol-induced behavioral stimulation and motor incoordination: effects of diltiazem and verapamil</i> .....	18
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>

## 1. Abstract

El alcohol es una de las sustancias psicoactivas más consumidas y aceptadas. Actualmente, es importante abordar esta problemática dado su alto nivel de consumo en la población mundial y las implicaciones que tiene en los individuos y la comunidad. Existen diferentes cascadas intracelulares responsables de los cambios en la función sináptica que intervienen como dianas moleculares del etanol. Entre las más estudiadas encontramos la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual es considerada clave en las respuestas neuroconductuales de dicha droga. Los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones mostraron que el pretratamiento con W7 (inhibidor de la CaM), redujo la estimulación locomotora inducida por etanol, así como que diltiazem y verapamilo (inhibidores canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L) redujeron la estimulación locomotora, sin alterar a la supresión inducida por etanol. Por un lado, dado que el pretratamiento con W7 bloqueó los efectos estimulantes del etanol, se asume que la CaM desarrolla un papel importante en las acción conductual inducida por el etanol. Por otro lado, el pretratamiento con diltiazem o verapimilo, bloqueó la estimulación locomotora inducida por el etanol, demostrando la importancia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en los efectos inducidos por esta droga.

*Palabras clave:* etanol, calcio, estimulación locomotora, efectos comportamentales.

Nowadays alcohol is one of the most consumed and accepted psychoactive substances. It's important to address this issue because of the high level of consumption around the world and its consequences on people and society. There are different intracellular cascades responsible for the changes observed in the synaptic function and for their role as molecular targets of ethanol. One of the most known is cAMP-dependent protein kinase (PKA) which is considered to play a key role in the observed neurobehavioral responses of ethanol consumption. Results obtained from different investigations showed that a pre-treatment with W7 reduced in a dose-dependent manner the locomotor stimulation produced by ethanol intake and that pre-treatment with diltiazem or verapamil prevented locomotor stimulation with no effect upon locomotor suppression produced by ethanol. These results demonstrated that pre-treatment with W7 decreased the ethanol-induced stimulating effects, so it is assumed that CaM plays an important role in the ethanol-induced behavioral actions. Finally, the pre-treatment with diltiazem or verapimil decreased the ethanol-induced locomotor stimulation suggesting that L-type calcium channels undertake an important role in the behavioral effects produced by ethanol.

*Keywords:* ethanol, calcium, locomotor stimulation, behavior effects.

## 2. Extended Summary

Nowadays alcohol is one of the most consumed and culturally worldwide accepted psychoactive substances. Damaging alcohol consumption actually constitutes an important source of problems, these include physical, psychological and social (infectious diseases, cancer, violence, labor absenteeism...). The intake of this substance affects not only to the individual who consumes but also to people close to him like family, friends and workmates.

Additionally the World Health Organization estimates that alcohol abuse causes 2,5 million deaths each year. This mainly affects to young people and it is considered to be the third most risky factor contributing to health problems in the world (WHO, 2010).

Ethanol is the type of alcohol most used in alcoholic drinks. It has many different effects on the organism possibly due to its action in diverse neuronal systems, which in addition interact between them. Currently there is no agreed explanation for the mechanisms underlying the action of ethanol and its influence on behaviour.

However, on account of the importance of this problem and its impact on community, research has been accomplished to study the different mechanisms underlying the ethanol-intake by which ethanol is able to alter cellular function and how some of these changes affect behaviour such as locomotor stimulation and ethanol-intake (Baliño, Pastor and Aragon, 2010). Two of the most important mechanisms are cAMP-dependent protein kinase (PKA) and cAMP response element-binding (CREB). Ethanol acts upon the different ion channels including both ligand-operated (NMDA, GABA, nACh and 5-HT<sub>3</sub>) and voltage-controlled ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ).

It has been found that the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) signalling pathway is an important modulator of ethanol sensitivity (Conti et al. 2009) meaning that it develops an important role in the ethanol-induced neurobehavioral responses. In relation there is research supporting the evidence of PKA activation after ethanol administration (Baliño, Ledesma and Aragón, 2014).

For these reasons this bibliographic review includes research that show what happens in the intracellular calcium-dependent activation ( $\text{Ca}^{2+}$ ) of the cascade of dependent protein kinase Camp (PKA) after the administration of ethanol.

Therefore for this bibliographic review the following objectives were covered: to collect scientific evidence showing the effects and consequences that ethanol has on  $\text{Ca}^{2+}$  levels and to describe the role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the locomotor stimulation induced by ethanol intake.

Literature searches were conducted from different sources of information like databases and scientific magazines. For that purpose the use of key words and relevant authors' names was essential. Once completed the search those documents which were most significant for the purposed objectives were selected.

Selected documents were: *Role of Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline on ethanol neurobehavioral effect*, which study CaM role, and *Participation of L-type calcium channels in ethanol-induced behavioral stimulation and motor incoordination: effects of diltiazem and verapamil*, which evaluate L- type calcium channels acting.

Data obtained in different investigations shows that a pre-treatment with W7 (CaM's inhibitor) reduces in a dose-dependent manner the locomotor stimulation produced by ethanol intake (Baliño et al. 2014) and that pre-treatment with diltiazem or verapamil (L-type inhibitors) prevents locomotor stimulation with no effect upon locomotor suppression produced by ethanol (Baliño et al. 2010).

On one hand, these results demonstrated that pre-treatment with W7 decreases the ethanol-induced stimulating effects, so it is assumed that CaM plays an important role in the ethanol-induced behavioural actions (Baliño, et. al 2014). On the other hand the pre-treatment with both diltiazem or verapamil decreases the ethanol-induced locomotor stimulation but has no effects on the locomotor suppression suggesting that L-type calcium channels undertake an important role in the behavioural effects produced by ethanol. In addition this data suggests that ethanol is more sensitive to this type of channel when compared with other psychostimulant drugs.

Finally, with the data from both studies, we can conclude that cAMP/PKA-dependent activation pathway has an important role in the mechanisms underlying locomotor behaviour and CNS activation induced by ethanol intake. This is why it is essential to conduct future studies in this research line.

### 3. Introducción

Actualmente, el *alcohol* es una de las sustancias psicoactivas más consumidas y culturalmente aceptadas a nivel mundial, junto con otras drogas de abuso como la cafeína y la nicotina. A lo largo de la historia se ha utilizado ampliamente en diferentes culturas, afectando individualmente y socialmente de numerosas y diferentes maneras.

El consumo nocivo de esta droga, con propiedades que pueden causar dependencia, se asocia con numerosos problemas de carácter económico y social como la violencia, abuso y absentismo infantil. Además afecta a aspectos sanitarios, ya que provoca un aumento de susceptibilidad a enfermedades infecciosas, así como un aumento del riesgo a sufrir numerosas enfermedades como pueden ser la cirrosis hepática y diversos tipos de cáncer.

Las consecuencias del consumo de alcohol no afectan exclusivamente al consumidor, sino que también perjudica a las personas del entorno, como pueden ser familiares, amigos o compañeros de trabajo, entre otros.

La Organización mundial de la Salud, OMS, estima que el abuso del alcohol causa cada año 2,5 millones de muertes, afectando mayoritariamente a personas jóvenes, convirtiéndolo así, en el tercer factor de riesgo de mala salud en el mundo (OMS, 2010). En concreto, la OMS, estimó que en 2002 el alcohol causó 1,8 millones de muertes. Una década después, el mismo organismo publica el informe de sobre la Situación Mundial del Alcohol y la Salud, donde afirman que en 2012 la cifra de personas fallecidas a causa del alcohol asciende a 3,3 millones (OMS, 214). Como se puede observar, el abuso de alcohol compone una problemática en continuo crecimiento y expansión.

Una de las regiones con mayor consumo per cápita de alcohol es Europa. Concretamente en España, según datos reflejados en el Informe del Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías (OEDT) correspondiente al año 2015: “el 93,1% de personas de entre 15 y 64 años ha tomado bebidas alcohólicas alguna ocasión en la vida”. Además, en este informe se estima que 1,6 millones de personas de entre 15 y 64 años tienen un consumo de alcohol de riesgo, lo que representa el 5% población total. Por otro lado, el consumo en atracón de alcohol (binge drinking) ha ganado popularidad a lo largo de los años y, aunque en 2013 la prevalencia se mantuvo estable respecto a 2011, en la última década se ha triplicado. Se estima que el 15,5% ha consumido alcohol en forma de atracón en los últimos 30 días. Este patrón de consumo se concentra en el grupo de jóvenes de 20 a 29 años (OMS, 2016).

Teniendo en cuenta esta información, se considera especialmente relevante abordar la problemática del consumo de alcohol, dado su elevado nivel de consumo en la población mundial, las altas tasas de mortalidad, las cuales además han experimentado un crecimiento con los años, y las implicaciones que tiene en los individuos (enfermedades físicas y mentales, costes económicos y sanitarios...) y en la comunidad.

Por último, se considera necesario adoptar medidas preventivas, con el objetivo de concienciar a la población de los riesgos asociados a la droga, medidas de protección y rehabilitación ante las consecuencias negativas provocadas por el alcohol, y aplicar políticas de reducción del uso nocivo de esta droga. Para que las distintas técnicas de intervención sean eficaces es imprescindible que se conozcan distintos aspectos relacionados con dicha droga como los principales mecanismos moleculares de acción y cuales son las consecuencias asociadas a su consumo.

### 3.1. Etanol

El alcohol que en mayor proporción contienen las bebidas alcohólicas es el *alcohol etílico* o *etanol*, el cual tiene una acción depresora del sistema nervioso central (Cortes-Romero, Galindo, Galicia-Isasmendi, 2011) y es ampliamente utilizado.

Éste tiene múltiples efectos en el organismo que se manifiestan en: procesos degenerativos e inflamatorios del Sistema Nervioso Central (SNC), deterioro mental y motor del cuerpo, efectos bioquímicos, de comportamiento y psicofarmacológicos. Además tejidos como el hígado, corazón, músculo esquelético, páncreas o tracto gastrointestinal se ven afectados (Fadda y Rossetti, 1998).

El hecho de que el etanol tenga tan diversas manifestaciones puede deberse a que no posee receptores específicos en el SNC, por lo que esta droga es capaz de influir sobre diferentes sistemas neuronales, los cuales, además, interactúan entre sí.

Los numerosos estudios llevados a cabo al respecto han sido capaces de detectar los cambios comportamentales producidos tras la administración de etanol. Sin embargo, actualmente no existe un marco teórico claro acerca de los mecanismos de acción molecular por los cuales el etanol es capaz de alterar la función celular y cómo algunas de estas alteraciones se traducen en cambios en el comportamiento (Baliño et al. 2010).

A pesar de no contar con unos mecanismos de acción claros, se han desarrollado distintos fármacos para tratar el abuso del alcohol. Para el desarrollo de éstos es imprescindible conocer los diferentes mecanismos por los que el etanol es capaz de alterar funciones del SNC.



### 3.1.1. *Dianas citoplasmáticas*

Los numerosos efectos que produce el etanol en sistemas neuronales, así como la complejidad de éstos, dependen de la simplicidad de su estructura química. Actualmente sabemos que existen diferentes cascadas intracelulares responsables de los cambios en la función sináptica, que además intervienen como dianas moleculares del etanol.

Entre las dianas moleculares más estudiadas y de mayor importancia encontramos la *proteína quinasa dependiente de AMPc* (PKA) y el *elemento de respuesta a la unión de AMPc* (cAMP response element-binding, CREB).

#### Proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA)

La PKA, pertenece al grupo de las proteínas quinasas. Éstas se activan por segundos mensajeros y desempeñan un papel importante en la transducción de señales al interior de la célula. Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato y de la *adenosina trifosfato* (ATP) a los grupos alcoholes de las serinas y treoninas, y al grupo fenol de las tirosinas en las cadenas proteicas (Locatelli, 2003). El proceso de fosforilación regula la actividad enzimática, la actividad de receptores y los canales iónicos.

Las quinasas y las fosfatasas, tienen un papel regulador en el metabolismo celular, ya que la información procedente del exterior es transformada en la célula a un patrón específico de activación que determina la respuesta de la célula.

PKA, es la última quinasa en una cascada intracelular dependiente de adenosín monofosfato cíclico, AMPc, es decir, se activa por un aumento de concentración de AMPc, sintetizado por adenilil ciclasas (AC) en la célula. Una vez activadas, estas proteínas son capaces de fosforilar factores de transcripción como CREB, los cuales se van a unir a sitios CRE (elementos de respuesta a AMPc), permitiendo a CREB activar o desactivar ciertos genes.

Estos procesos se pueden ver reflejados en la conducta del individuo ya que esta proteína es descrita como un intermediario que participa en las respuestas neuroconductuales del etanol. Hay estudios que otorgan un rol importante a esta vía de señalización PKA en la aparición de conductas inducidas por etanol, además se ha demostrado que una exposición aguda de etanol puede alterar esta vía (Baliño, Ledesma y Aragon, 2014).

### Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB)

CREB es una proteína, presente en todas las células del cerebro, con capacidad de actuar como factor de transcripción. Estos factores participan en la regulación de la transcripción del ADN, en la regulación de la plasticidad neuronal y en la potenciación a largo plazo, además de tener un papel importante en el desarrollo de adicción a las drogas. Hay estudios que han demostrado que CREB es capaz de modular comportamientos inducidos por etanol.

Por otro lado hay dianas moleculares como la *fosfoproteína regulada por la dopamina y AMPc de 32 KDa* (DARPP-32) y la proteína *Fyn*, las cuales interaccionan con el etanol mediante la modulación de los receptores de *glutamato N-metil-D-aspartato* (NMDA); la proteína *Quinasa C* (PKC) cuyas isoformas (clasificadas en convencionales, nuevas y atípicas) tienen la capacidad de actuar como dianas del etanol, tanto de forma aguda como crónica; la *fosfolipasa D* (PLD) considerada una de las pocas enzimas basada en la interacción enzima-sustrato; y las *adenilil ciclasas* (AC), cuyo papel es sintetizar AMPc a partir de ATP, pueden ser moduladas por el etanol a través de proteínas,  $Ca^{2+}$ , etc.

#### 3.1.2. Acción del etanol sobre canales iónicos

Los canales iónicos están constituidos por varias proteínas integradas en la membrana plasmática celular formando poros. Éstos establecen y controlan el flujo de iones presente en la membrana, presentan selectividad iónica y tienen capacidad de adoptar diferentes estados conformacionales; abierto, inactivo y de reposo. (Menéndez, 2004). Estos estados varían en función de los cambios en el potencial de membrana o como respuesta a la unión y/o separación de un ligando (Remiro, 2014). Además, los canales iónicos se encargan de la transcripción de genes, el balance hídrico y actúan como dianas de fármacos.

Como se puede observar en la *Imagen 1* (recuperada de: <https://www.asturnatura.com>), los canales iónicos se pueden dividir en principalmente en dos grupos: *canales controlados por ligando* y *canales dependientes de voltaje*.

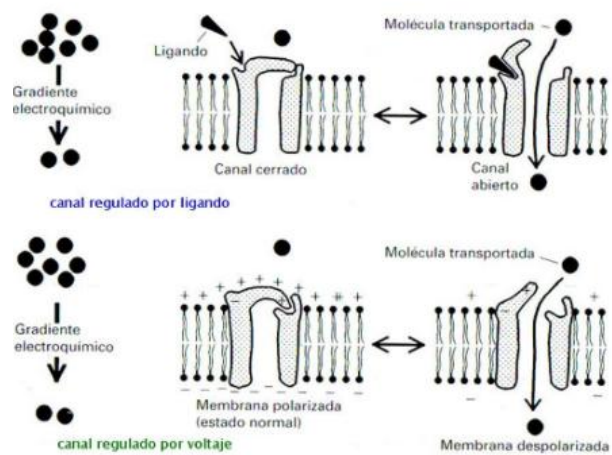


Imagen 1. Tipos de canales iónicos.

### Canales iónicos controlados por ligando

Éstos se encuentran ubicados en los receptores post-sinápticos y están formados por proteínas. Su permeación depende de la unión de un ligando (neurotransmisores, péptidos u hormonas), el cual interacciona con uno o varios dominios de la proteína transportadora. Dicha unión provoca un cambio de energía y por tanto un cambio de estado de la proteína dando lugar a la apertura del canal. La interacción dependerá de la complementariedad que presenten dicho ligando y el canal. Generalmente, los neurotransmisores que actúan sobre estos receptores producen efectos rápidos ya que no existen intermediarios en el proceso.

Este tipo de proceso es seguido por muchos neurotransmisores del sistema nervioso. En el caso del etanol, la mayoría de los efectos producidos por éste se deben a la unión con receptores post-sinápticos como el glutamato NMDA y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A (GABA-A), principalmente. Aunque también tienen relevancia para el etanol los de *acetilcolina de tipo nicotínico* (nACh) y los *receptores 5-hidroxitriptamina-3* (5-HT3).

- *NMDA*

El glutamato, uno de los neurotransmisores con mayor abundancia en el sistema nervioso, lleva a cabo su acción excitadora cuando actúa en receptores específicos, como los receptores NMDA. Éstos permiten la entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y por el contrario bloquean la entrada de  $\text{Mg}^{++}$  (Flores-Soto, Chaparro-Huerta, Escoto-Delgadillo, Vazquez-Valls, González- Castañeda y Beas-Zarate, 2012), siendo el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  el más significativo.

Estos canales desempeñan numerosas funciones tales como aprendizaje, el proceso de formación de memorias memoria y la plasticidad sináptica, los cuales garantizan el correcto funcionamiento cerebral.

Los receptores NMDA están compuestos por combinaciones de distintas subunidades: *NMDAR1*, *NMDAR2* y *NMDAR3* (Flores-Soto, et al. 2012). La administración aguda de etanol conlleva la inhibición de las distintas subunidades de los canales NMDAR. Sin embargo, la exposición crónica, da lugar a un aumento de estas subunidades como mecanismo de compensación homeostática.

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que los canales NMDA están relacionados con la tolerancia o retirada del etanol (Chandrasekar, 2013; Loeches y Guerri, 2011; Lovinger, 1995).

- *Acido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)*

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico es el mensajero químico inhibitor más abundante en el sistema nervioso central (Cortes-Romero, et al. 2011). Actúa como neurotransmisor y se forma a partir del glutamato mediante la enzima *ácido glutámico descarboxilasa (GAD)*.

Este neurotransmisor tiene la capacidad de unirse a dos tipos de receptores: *GABA tipo A* (GABAA), principal objetivo farmacológico del etanol, y *GABA tipo B* (GABAB).

El etanol inhibe la excitabilidad controlada por receptores NMDA y potencia la función de GABAA. Por otra parte, se ha demostrado que el aumento de la actividad del GABA, producido por esta droga, media conductas como ingesta de etanol (Nie, Rewal, Gill, Ron y Janak, 2011; Rewal, Donahue, Gill, Nie, Ron, y Janak, 2012), tolerancia (Liang, Suryanarayanan, Abriam, Snyder, Olsen y Spigelman, 2007), efectos hipnóticos, anticonvulsivos y ansiolíticos (Kumar, et al. 2009).

- *Receptores de acetilcolina (ACh)*

La acetilcolina (ACh) puede interactuar con dos grandes familias de receptores: *muscarínicos* (mAChR) y *nicotínicos* (nAChR). Éstos reciben dichos nombres debido a su afinidad a los agonistas *Muscarina* y *Nicotina*, respectivamente. Estos últimos son canales iónicos activados por ligando.

Los receptores nicotínicos neuronales se componen de dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales, a su vez, se componen de distintos subtipos. La cuantiosa variedad de receptores de este tipo viene dada gracias a la combinación de los distintos subtipos.

Estos receptores, nAChR, aumentan la cantidad y, con ello, la función de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Están implicados en mecanismos de aprendizaje, memoria, atención, percepción sensorial, percepción del dolor, control de la actividad motora y regulación corporal (Máiquez, 2008), además, modulan la autoadministración de etanol. Sin embargo, se postula su implicación con un gran número de patologías neuronales.

También hay estudios que los relacionan con procesos de dependencia a diferentes drogas como el etanol, la cocaína y la nicotina, ya que estos receptores son capaces de cambiar la neurotransmisión de dopamina en el sistema mesolímbico (Picciotto, et al. 1998). En concreto, el etanol tiene la capacidad de estimular la vía dopaminérgica del sistema activando los nAChR (Ericson, Blomqvist, Engel, y Söderpalm, 1998; Söderpalm, Olausson, Blomqvist, y Engel, 2000).

Por otro lado, el etanol es capaz de potenciar la actividad de estos receptores desarrollando un rol fundamental en la regulación de la conducta motivada (Ericson, et al. 1998; Ericson, Molander, Löf, Engel y Söderpalm, 2003).

Finalmente, en diversas investigaciones, mediante un modelo de roedor, se ha visto que es posible actuar sobre distintas subunidades de los receptores nicotínicos, mediante fármacos, reduciendo así la ingesta voluntaria de etanol (Jerlhag, Grøtli, Luthman, Svensson y Engel, 2006).

- *Receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT)*

Los receptores para 5-HT están implicados en diversos procesos entre ellos la modulación del comportamiento, la actividad neuronal y la liberación de neurotransmisor (Hoyer, Hannon y Martin, 2002).

En la actualidad, se conocen catorce clases de este tipo de receptores, todos ellos englobados en *receptores acoplados a proteínas G* (RAPG), a excepción del 5-HT<sub>3</sub>, el cual es un canal iónico (Medina, 2013). Este último interviene en la ingesta de etanol (Sari, Johnson y Weedman, 2011), así como en distintos procesos que median los efectos sedativos del mismo.

#### Canales iónicos dependientes de voltaje

Los *canales dependientes de voltaje*, VOC<sub>S</sub>, son aquellos cuya permeación depende de un cambio en el voltaje del lugar de la membrana celular donde se encuentra situado.

El paso de iones se lleva a cabo mediante procesos de activación e inactivación. La activación, es decir la apertura del canal, se da como respuesta a los cambios en el potencial de membrana, mientras que en el proceso de inactivación se lleva a cabo el cierre del canal.

Los VOCs, cuentan con permeabilidad selectiva de iones, median en la generación y propagación de señales eléctricas y participan en la homeostasis celular.

Ejemplos importantes de este tipo de canal son los de sodio ( $\text{Na}^+$ ) potasio ( $\text{K}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloro ( $\text{Cl}^-$ ).

- *Sodio ( $\text{Na}^+$ )*

Estos canales constituyen proteínas transmembrana, compuestas por una subunidad  $\alpha$  (sensor de voltaje), una  $\beta 1$  y una  $\beta 2$  (moduladoras), que permiten el paso de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) a través de la célula.

El transporte de iones llevado a cabo es pasivo. Los *canales de sodio dependientes de voltaje* ( $\text{NaV}_S$ ) son los responsables de la despolarización de la membrana y pueden ser inhibidos por el etanol.

- *Potasio ( $\text{K}^+$ )*

Los canales de potasio dependientes de voltaje ( $\text{KV}_S$ ) participan en la polarización e hiperpolarización de la membrana. Se conocen más de 20 tipos, los cuales se pueden clasificar según a su biología molecular.

Atendiendo al grado de conductancia, los  $\text{KV}_S$  pueden clasificarse en: canales de baja conductancia, de intermedia y de alta conductancia. En esta última categoría encontramos los *canales BK*, los cuales son canales iónicos mixtos, es decir, son dependientes tanto de voltaje como de calcio (Vergara, Latorre, Marrion y Adelman, 1998; Dopico, Widmer, Wang, Lemos y Treistman, 1999). Éstos se encargan de funciones como la excitabilidad neuronal, la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica.

En lo que respecta al etanol, hay investigaciones que afirman que los canales BK juegan un papel importante tanto en los efectos neuroconductuales, como en el consumo y la tolerancia aguda al etanol (Treistman y Martin, 2009).

- *Calcio ( $Ca^{2+}$ )*

Los canales de calcio dependientes de voltaje ( $CaV_S$ ) se componen de dos subunidades  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$ . Están regulados por las variaciones de voltaje y por los receptores GABAB presinápticos. Se encuentran involucrados en la transmisión del impulso nervioso y en la liberación de neurotransmisores.

Se conocen 6 tipos de  $CaV_S$ , entre los cuales se encuentran los *canales de  $Ca^{2+}$  tipo L*. Éstos son los más estudiados ya que se encuentran en la mayoría de células (excitables y no excitables), además forman la principal vía de entrada de  $Ca^{2+}$  y participan en la secreción de neurotransmisores (Izaquirre y Zavaleta, 1998). Asimismo, están involucrados en la respuesta neurobiológica a diferentes drogas (Baliño, et al. 2010).

Actualmente, no se ha podido establecer con claridad los efectos del etanol sobre estos canales, pero existen diversas investigaciones que asumen que el etanol potencia su actividad. Sin embargo, hay investigaciones que apuntan a que antagonistas de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L provocan la disminución del consumo voluntario de etanol (Fadda, Garau, Colombo y Gessa, 1992), tienen la capacidad de modular la discriminación a este (Colombo, Lobina, Reali, Fadda y Gessa, 1994), reducir las manifestaciones del síndrome de abstinencia (Littleton, Little y Whittington, 1990) y modular la actividad locomotora provocadas por el etanol (Baliño, et al. 2010).

### 3.2. Calcio

El  $Ca^{2+}$ , es un regulador biológico universal. Además, constituye una de las señales bioquímicas más importantes que median en la actividad celular (Berridge, 1997). En concentraciones altas y prolongadas constituye un elemento con un elevado nivel de toxicidad, el cual amenaza el estado de salud del individuo, pudiendo provocar daños irreversibles, e incluso la muerte. Debido a ello, nuestro organismo lleva a cabo una serie de respuestas adaptativas con el objetivo de mantener una buena salud. Es decir, cuando existe un desequilibrio interno, nuestras células son capaces de autorregularse mediante mecanismo homeostáticos con fin de controlar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ .

El control de la concentración de este ión depende de numerosas moléculas encargadas de su unión y transporte (Fernández-Belda, Plenge-Tellechea, Fortea y Soler, 1997). Las células de nuestro organismo cuentan con numerosos mecanismos por los cuales puede llevar a cabo una variación de las concentraciones de  $Ca^{2+}$ .

Podemos encontrar mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula mediante los diferentes canales iónicos, como los mencionados anteriormente en el presente trabajo. Pero además, se producen mecanismos de salida, donde el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado de depósitos internos como: el *retículo endoplásmico* (ER), el cual lleva a cabo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , controlada por *inositol- 1, 4, receptor de 5-trifosfato* (InsP3R), el receptor de *Rianodina* (RyR) y el *sarco (endo) retículo endoplásmico  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa* (SERCA); las mitocondrias, que lo hacen de manera pasiva; y los compartimentos ácidos.

### 3.3. Calcio y etanol

Para concluir, es importante remarcar la influencia que el etanol ejerce sobre el flujo y distribución del calcio. La literatura acerca de esta problemática cuenta con numerosos estudios al respecto, los cuales han permitido establecer los cambios comportamentales producidos tras la administración de etanol. Sin embargo, actualmente no existe un marco teórico claro acerca de los mecanismos de

acción molecular por los cuales el etanol es capaz de alterar la función celular, y cómo algunas de estas alteraciones se traducen en cambios en el comportamiento.

De manera general, gracias a determinadas investigaciones podemos asumir que el aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , en cultivos celulares, es causado por la exposición a concentraciones de etanol biológicamente relevantes (Daniell y Harris, 1989; Mironov y Hermann, 1996).

Por último, hay estudios indican que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula se llevan a cabo, mayoritariamente, mediante canales de calcio dependientes de voltaje. No obstante, se ha demostrado que tras la administración de etanol en cultivos de células, los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  están mediados por la liberación de reservas de este ión.



#### 4. Metodología

El proceso completo seguido para llevar a cabo la presente revisión bibliográfica se encuentra esquematizado a continuación (ver *Imagen 2*):



*Imagen 2. Proceso metodológico.*

Para poder comenzar con el proyecto fue imprescindible proponer objetivos. Por lo que previamente a la puesta en marcha de la revisión bibliográfica se plantearon los *objetivos* del presente trabajo, los cuales eran:

- Plasmar las evidencias encontradas acerca de los efectos del etanol en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , y sus consecuencias
- Identificar y clarificar los mecanismos de acción del etanol
- Describir el rol del  $\text{Ca}^{2+}$  en la estimulación locomotora provocada por etanol.

Una vez establecidos los objetivos, se configuró la estrategia de búsqueda. Para lograr una adecuada revisión bibliográfica es importante tener en cuenta diferentes tipos de fuentes de información (artículos, tesis, revistas, bases de datos, entre otros), así como plantear y seleccionar conceptos clave para la búsqueda.

Inicialmente, se plantearon *conceptos clave* relacionados con el tema elegido tanto en inglés como en español, tales como: etanol (ethanol), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ , calcium), estimulación locomotora (locomotor stimulation), consumo de etanol (etanol intake), farmacología (pharmacology), modelo animal (mice), comportamiento cerebral (behavior brain) y canales iónicos (ionic channels). Además, se plantearon nombres de autores específicos que han trabajado en el tema como: Michael Berridge, Fabio Fadda, Carlos M.G. Aragón y Pablo Baliño.

Tras la selección de palabras clave se realizó una *búsqueda bibliográfica*, la cual tuvo lugar en Febrero de 2017 en bases de datos como: Medline (a través de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), SciELO (<http://scielo.isciii.es/scielo.php/>), Elsevier (<http://www.elsevier.es/es>) y ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>).

Asimismo, con el fin de obtener datos sobre el etanol en España, se realizó una búsqueda en la página web oficial del Gobierno de España (<http://www.msssi.gob.es/>), concretamente en el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. De la misma manera, también se ha consultó la página de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

La búsqueda concluyó con 55 documentos encontrados los cuales se *seleccionaron* en función de: el título, el cual aporta información sobre la utilidad para el presente trabajo; el autor, seleccionando aquellos que eran especialmente relevantes en la literatura relacionada con el etanol y el  $Ca^{2+}$ , el resumen y los resultados, seleccionado los que siguieran la línea del esta revisión. Por otro lado, también se tuvieron en cuenta en el proceso de selección la calidad metodológica de los documentos, la relevancia de las investigaciones y la calidad de información proporcionada.

Una vez finalizada la búsqueda y selección de los documentos, se procedió a *lectura crítica* de los documentos escogidos. Se eliminaron aquellos documentos, que tras la lectura crítica, no eran se adecuaban a esta revisión, y se organizaron aquellos que facilitarían la elaboración del apartado de introducción. Dado el gran número de artículos relevantes encontrados al respecto, se consideró oportuno seleccionar dos investigaciones para el análisis de resultados, discusión y conclusiones (ver *Tabla 1*). Estos dos documentos se seleccionaron teniendo en cuenta la relevancia, los autores y la vigencia, entre otros criterios.

Título	Autor	Año
Role of $Ca^{2+}$ /calmodulin on ethanol neurobehavioral effects	Baliño, Ledesma y Aragon	2014
Participation of L-type calcium channels in ethanol-induced behavioral stimulation and motor incoordination: effects of diltiazem and verapamil	Baliño, Pastor y Aragon	2010

*Tabla 1. Organización de artículos seleccionados.*

## 5. Resultados

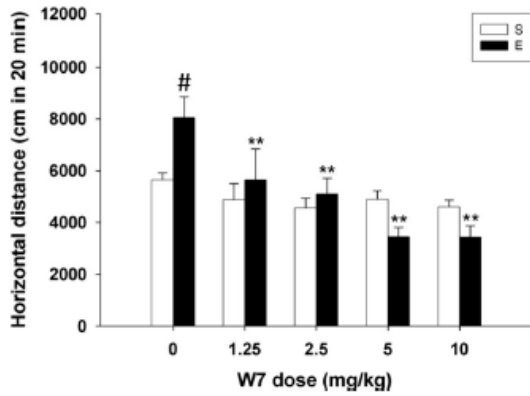
### 5.1. Estudio 1: *Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin on ethanol neurobehavioral effects*

El objetivo de estudio de esta investigación era determinar el papel de la calmodulina (CaM, proteína clave en la transducción de la señal en respuesta al aumento del calcio intracelular) en la activación inducida por etanol, así como evaluar los efectos que tiene en la estimulación locomotora. Para ello se utilizaron ratones Swiss, los cuales fueron pretratados con W7, un inhibidor selectivo de la CaM, previamente a la administración de etanol. Los ratones fueron sometidos a una prueba de campo abierto, donde se midió la actividad locomotora horizontal.

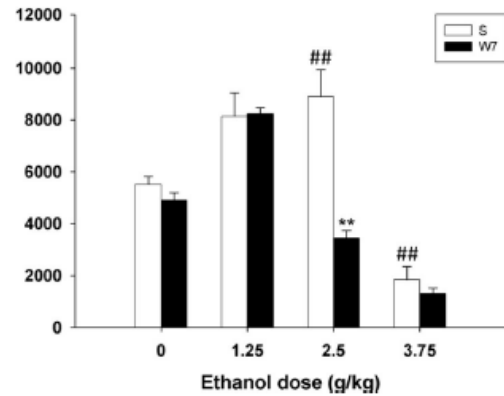
En esta investigación se llevaron a cabo diferentes experimentos con el objetivo de estudiar diferentes variables. En los dos primeros experimentos realizados se estudiaron los efectos de W7 sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

En primer lugar se observaron los *efectos de W7 en la estimulación conductual inducida por etanol*. En este sentido, el análisis de varianzas, ANOVA, mostró que existe un efecto significativo del pretratamiento con W7 ( $F(4, 88)=6.8$ ;  $p<0.01$ ). Las comparaciones de medias basadas en la interacción significativa entre el pretratamiento con W7 y el tratamiento con etanol ( $F(4, 88)=3.26$ ;  $p<0.01$ ) revelaron que W7 reduce la estimulación psicomotora inducida por etanol. Seguidamente, la prueba post hoc, Newman-Keuls, mostró que las diferencias significativas según la dosis de W7 administrada se encontraban en los grupos tratados con etanol ( $p<0.01$ ) en comparación con los grupos tratados con solución salina (*Gráfica 1*).

En segundo lugar se estudiaron los *efectos de W7 en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol*. El ANOVA mostró que existían diferencias significativas tanto en la dosis de etanol ( $F(3, 65)=52.76$ ;  $p<0.01$ ) como en la dosis del pretratamiento con W7 ( $F(1, 65)=16.56$ ;  $p<0.01$ ). Se obtuvo una interacción significativa entre la dosis de pretratamiento con W7 y la dosis de tratamiento con etanol ( $F(3, 65)=11.92$ ;  $p<0.01$ ). Comparaciones pos hoc entre los grupos pretratados con solución salina mostraron diferencias significativas en la distancia recorrida inducida por las dosis de etanol de 1.25, 2.5, o 3.75 g/kg ( $p<0.01$ ). Por último, análisis posteriores mostraron diferencias significativas entre el pretratamiento con solución salina y con W7 cuando la dosis de etanol administrada es 2.5 g/kg ( $p<0.01$ ), esto no se observó en las dosis 1.25 o 3.75 (*Gráfica 2*).

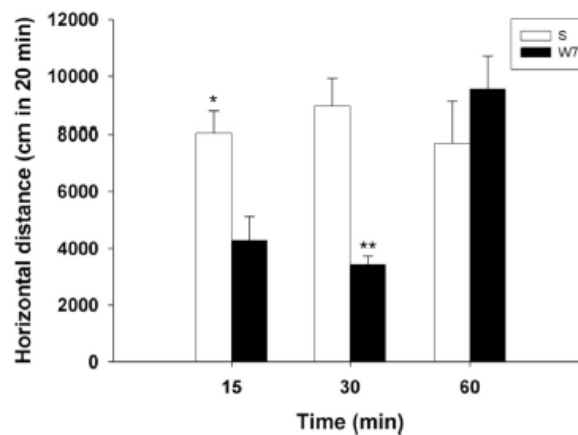


Gráfica 1. Efectos de W7 en la estimulación conductual inducida por el etanol.



Gráfica 2. Efectos de W7 la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.

El tercer experimento llevado a cabo en esta investigación estudió el *patrón temporal de los efectos de W7 sobre la actividad locomotora inducida por etanol*. Con respecto a esto, el ANOVA mostró diferencias significativas en cuanto al pretratamiento con W7 ( $F(1, 59)=11.33$ ;  $p<0.01$ ) así como en a la variable tiempo ( $F(2, 59)=4.39$ ;  $p<0.05$ ). Se encontró una interacción significativa entre ambas variables ( $F(2, 59)=8.66$ ;  $p<0.05$ ). Por último, la prueba de Newman-Keuls reveló que W7 resultó efectivo en la disminución de los efectos estimulantes inducidos por etanol a los 15 y 30 minutos (Gráfica 3).



Gráfica 3. Patrón temporal de los efectos de W7 sobre la actividad locomotora inducida por etanol.

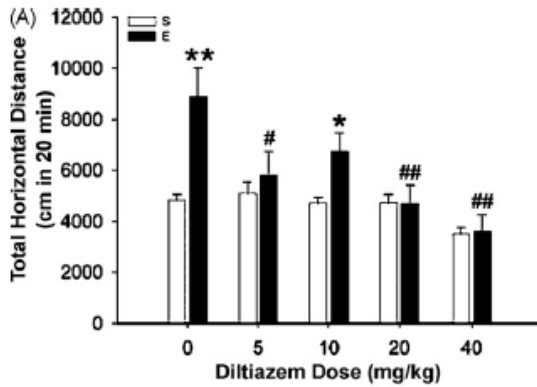
5. 2. Estudio 2: *Participation of L-type calcium channels in ethanol-induced behavioral stimulation and motor incoordination: effects of diltiazem and verapamil*

En esta investigación se estudió el rol de diversos inhibidores de los canales  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en los efectos psicomotores producidos por el etanol. Para ello, ratones Swiss fueron pretratados con compuestos que bloquean los canales de calcio, concretamente diltiazem o verapamilo, previamente a la administración de etanol. Los ratones fueron puestos en un campo abierto, donde se midió la actividad locomotora horizontal.

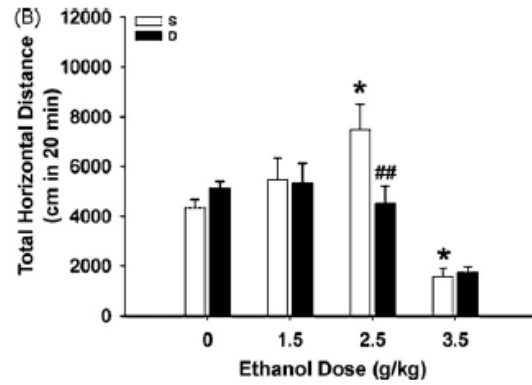
Para la realización de este estudio se llevaron a cabo diferentes experimentos. Los experimentos 1 y 2 se realizaron con el objetivo de estudiar los efectos del diltiazem sobre la estimulación locomotora inducida por etanol.

En el primer experimento se estudiaron los *efectos del diltiazem en la estimulación conductual inducida por etanol*. El análisis de varianza, ANOVA, mostró que existe un efecto significativo de la dosis de diltiazem [ $F(4, 107) = 7.5, p < 0.01$ ] así como de la dosis de etanol [ $F(1,107)=5.5, p < 0.01$ ]. Las comparaciones de medias basadas en la interacción significativa entre el pretratamiento con diltiazem y el tratamiento con etanol [ $F(4,107) = 3.6, p < 0.01$ ] revelaron que diltiazem reduce la estimulación psicomotora inducida por etanol. Tras este análisis, la prueba de Newman-Keuls entre los grupos tratados con etanol mostraron diferencias significativas en las dosis 5 ( $p < 0.05$ ), 20 y 40 ( $p < 0.01$ ) mg/kg en comparación con los tratados con solución salina (Gráfica 4).

El experimento 2 se dirigió a estudiar los *efectos del diltiazem en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol*. Para ello se llevó a cabo un ANOVA, el cual mostró un efecto significativo de la dosis de etanol [ $F(3, 92) = 19.5, p < 0.01$ ]. Se obtuvo un efecto de interacción significativo entre la dosis del pretratamiento con diltiazem y la dosis del tratamiento con etanol [ $F(3, 92) = 3.1, p < 0.05$ ]. Además, las comparaciones post hoc entre grupos pretratados con solución salina mostraron diferencias de en la distancia recorrida inducidas por 2.5 o 3.5 g/kg ( $p < 0.01$ ). Análisis posteriores revelaron diferencias significativas entre los grupos pretratados con solución salina y los pretratados con diltiazem cuando se administró una dosis de etanol de 2.5 g/kg ( $p < 0.01$ ) (Gráfica 5).



Gráfica 4. Efectos del diltiazem en la estimulación conductual inducida por etanol.



Gráfica 5. Efectos del diltiazem en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol.

En el tercer experimento se estudió el *patrón temporal de los efectos del diltiazem en la estimulación locomotora inducida por etanol*, para ello se llevó a cabo un ANOVA que reveló un efecto significativo del pretratamiento [ $F(1, 64) = 16.40, p < 0.01$ ], así como un efecto significativo de interacción entre el pretratamiento con diltiazem y el tiempo [ $F(3, 64) = 5.0, p < 0.01$ ]. El análisis post hoc mostró que la inyección de diltiazem simultáneamente o 30 minutos antes del tratamiento con etanol produjo un bloqueo significativo de la actividad locomotora inducida por dicha droga ( $p < 0.01$ ) (Tabla 2).

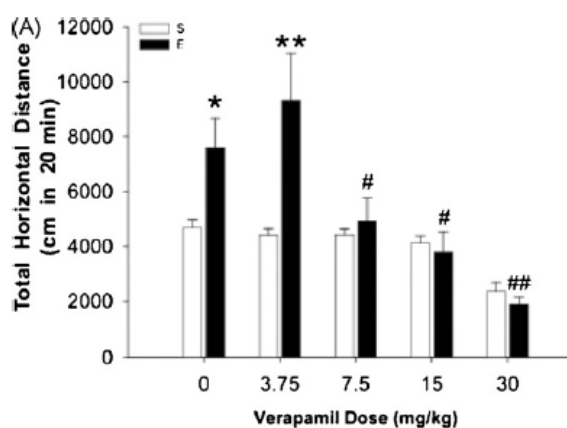
Pre-treatment	Time after pre-treatment (min)			
	0	30	60	90
Vehicle	7594 ± 1637	8780 ± 905	6096 ± 1197	7404 ± 617
Diltiazem	2270 ± 314*	3173 ± 428**	6040 ± 1099	7242 ± 865

Tabla 2. Patrón temporal de los efectos del diltiazem en la estimulación locomotora inducida por etanol

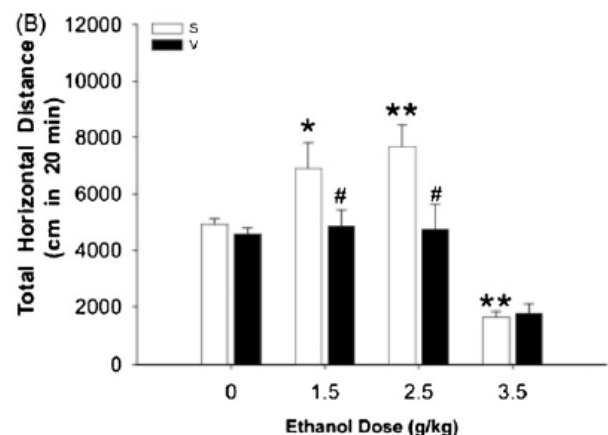
En esta investigación se llevó a cabo otro experimento para estudiar los *efectos del verapimilo sobre la estimulación locomotora inducida por etanol*. En la Gráfica 6 se muestran los datos recogidos en este experimento. El ANOVA reveló un efecto significativo en la dosis del pretratamiento con verapimilo [ $F(4, 125) = 11.5, p < 0.01$ ] así como en la dosis del tratamiento con etanol [ $F(1, 125) = 8.5, p < 0.01$ ]. La administración de etanol produjo un aumento significativo de la actividad locomotora, cuyo efecto fue reducido por verapimilo. Este último dato fue apoyado por la interacción significativa encontrada entre la dosis del pretratamiento con verapimilo y la dosis del tratamiento con etanol [ $F(4, 125) = 4.4, p < 0.01$ ]. Comparaciones posteriores (Newman-Keuls) entre los grupos tratados con etanol mostró que las dosis de 7.5, 15 ( $p < 0.05$ ) y 30 mg/kg ( $p < 0.01$ ) de verapimilo redujeron la estimulación inducida por etanol.

Esto no se observó en los grupos pretratados con solución salina. Únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad locomotora inducida por el etanol en aquellos animales pretratados con solución salina ( $p < 0.05$ ) y con 3.75 mg/kg de verapimilo ( $p < 0.01$ ).

Por otro lado se estudio el *efectos del verapimilo en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol*. Como se puede observar en la *Gráfica 7*, el análisis ANOVA reveló un efecto significativo en la dosis del pretratamiento con verapimilo [ $F(1, 192) = 10.2, p < 0.05$ ] así como en la dosis del tratamiento con etanol [ $F(3, 92) = 27.0, p < 0.01$ ]. Además este análisis mostró que existe un efecto significativo de interacción entre la dosis del pretratamiento con verapimilo y la dosis de tratamiento con etanol [ $F(3, 92) = 3.2, p < 0.05$ ]. Las comparaciones entre grupos pretratados con solución salina mostraron diferencias significativas inducidas por diferentes dosis de etanol: 1.5, 2.5 g/kg (estimulación locomotora;  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente) y 3.5 g/kg (supresión locomotora;  $p < 0.01$ ). Por último, análisis posteriores revelaron que el verapimilo redujo la estimulación locomotora inducida por etanol (en dosis de etanol de 1.5 y 2.5 g/kg;  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente).



Gráfica 6. Efectos del verapimilo sobre la estimulación locomotora inducida por etanol



Gráfica 7. Efectos del verapimilo en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol

Por último se llevó a cabo un experimento con el fin de estudiar el *patrón temporal de los efectos del verapimilo en la estimulación locomotora inducida por etanol*. Como se puede observar en la *Tabla 2*, los resultados del ANOVA mostraron que existe un efecto significativo de la administración de verapimilo [ $F(1, 64) = 19.4, p < 0.01$ ] así como un efecto significativo de interacción entre el pretratamiento con verapimilo y el tiempo [ $F(3, 64) = 3.2, p < 0.01$ ]. Los análisis post hoc indicaron que los animales a los que se les inyectó etanol 60 o 90 minutos después de verapimilo no obtuvieron diferencias significativas con respecto a los grupos control.

Finalmente, se observó que la inyección de verapimilo simultánea o 30 minutos antes del tratamiento con etanol bloqueó la estimulación locomotora ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente).

Pre-treatment	Time after pre-treatment (min)			
	0	30	60	90
Vehicle	7430 ± 1382	8507 ± 1078	7365 ± 911	7426 ± 734
Verapamil	2947 ± 341*	3167 ± 576**	6149 ± 1098	6856 ± 926

*Tabla 3. Patrón temporal de los efectos del verapimilo en la estimulación locomotora inducida por etanol*

## 6. Discusión

Los datos presentados por la OMS en 2016 revelan que el alcohol es una de las sustancias psicoactivas más consumidas a nivel mundial. El consumo nocivo de esta droga tiene numerosas consecuencias en el organismo del individuo como deficiencias en el funcionamiento hepático, disminución de la fuerza muscular por déficit de vitaminas, aceleración de los procesos arterioscleróticos, diferentes tipologías de cáncer y cambios en los procesos metabólicos, entre otras. Las consecuencias derivadas del consumo de alcohol afectan también al entorno del consumidor, el cual puede mostrar una conducta agresiva y violenta (Bolet y Suárez, 2003).

Como hemos señalado, el etanol tiene múltiples efectos, los cuales podrían explicarse porque dicha droga es capaz de actuar sobre diferentes sistemas neuronales. Actualmente no están claros los mecanismos de acción por los cuales el etanol es capaz de influir en determinados comportamientos. A pesar de ello, hay numerosas investigaciones que pretenden identificar los efectos neurocomportamentales inducidos por la ingesta de etanol. En concreto en la presente revisión, se han recopilado datos acerca de los efectos en la actividad locomotora inducidos por el etanol.

En el *primer estudio* se investigó el efecto de la inhibición de la CaM con W7 en la estimulación inducida por etanol. En cuanto a los efectos de W7 en la estimulación conductual inducida por etanol, los datos obtenidos revelaron que el bloqueo de CaM redujo los efectos activadores inducidos por el etanol, dependiendo de la dosis del pretratamiento con W7.

Los datos obtenidos en el experimento que evaluó los efectos de W7 en la actividad locomotora inducidos por diferentes dosis de etanol revelaron que la supresión de la actividad motora inducida



altas dosis no se vio afectada por el pretratamiento con W7.

En cuanto al tercer experimento, donde se midió el patrón temporal de los efectos de W7 sobre la actividad locomotora inducida por etanol, reveló que existe una interacción en los periodos cortos (15 y 30 minutos), mientras que en periodos largos (60 minutos) se observó una recuperación de los efectos de la administración de W7. Además se puede concluir que el bloqueo de la CaM tiene un efecto destacado cuando comparamos el etanol con otras drogas.

El objetivo del *segundo estudio* era averiguar el rol de diferentes compuestos inhibidores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, en concreto de diltiazem y verapimilo, en los efectos psicomotores inducidos por etanol. Los experimentos dirigidos a estudiar los efectos del diltiazem y verapimilo en la estimulación conductual inducida por etanol, revelaron que ambos compuestos reducen específicamente la estimulación locomotora de manera dependiente de la dosis. En cambio, éstos no tuvieron efectos en la locomoción basal o la supresión de la actividad locomotora. Además, los datos obtenidos en este estudio sugieren que el etanol necesita el completo funcionamiento de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L para poder provocar cambios en la estimulación conductual. Por otro lado, hay estudios que afirman que el pretratamiento con otros compuestos inhibidores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, como *nitrendipino* y *felodipino*, bloquean los efectos estimulantes inducidos por el etanol (Watson, Homewood y Little, 1998).

En cuanto al estudio de los efectos de diltiazem y verapimilo en la actividad locomotora inducida por diferentes dosis de etanol, se observó que la disminución de la actividad locomotora inducida por la administración de altas dosis de etanol (3,5 g / kg) no se vio afectada por la administración de diltiazem o verapimilo. Al respecto, hay investigaciones afirman que el *nifedipino*, un inhibidor de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, es capaz de potenciar los efectos depresivo-motores inducidos por el etanol (4,5 g / kg) (White y Smith, 1992; Engel, Fahlke, Hulthe, Hård, Johannessen, Snape, y Svensson, 1988).

Por último con respecto a los experimentos llevados a cabo para estudiar el patrón temporal de los efectos del diltiazem y el verapimilo en la estimulación locomotora inducida por etanol, los datos obtenidos revelaron ninguno de los efectos producidos por estos compuestos en la estimulación inducida por el etanol fueron afectados por el tiempo. Asimismo, en este estudio hay pruebas que sugieren que la reducción de la estimulación inducida por etanol observada después del pretratamiento con diltiazem o verapimilo puede no deberse una mejora selectiva de los efectos depresores/atáxicos del etanol. Respecto a este punto, hay investigaciones que afirman que el antagonismo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  no afecta a la ataxia inducida por etanol (Czarnecka y Kubik-Bogucka, 1993). Por ello, se puede concluir que existe un intervalo de dosis de diltiazem

y verapimilo que parece ser capaz de bloquear los efectos estimulantes del etanol sin aumentar los efectos depresores/atáxicos del etanol.

Por otro lado, hay datos que sugieren que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo L es especialmente importante en los efectos estimulantes inducidos por el etanol. En cambio esto no ocurre en otros fármacos, lo que revela que el mecanismo molecular de acción más destacado del etanol implica a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L.

Un factor principal que puede contribuir a explicar esta diferencia entre fármacos podría ser la participación del metabolito del etanol, el *acetaldehído*. En relación a este aspecto, hay investigaciones que afirman que varios efectos, como la estimulación locomotora inducida por el etanol, están mediados por las acciones centrales de este metabolito (Quertemont, Tambour y Tirelli, 2005; Quertemont y Tambour, 2004; Smith, Aragon y Amit, 1997). Asimismo, hay autores que asumen que las acciones del etanol sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden estar mediadas por el acetaldehído (Bergamaschi, Govoni, Rius, y Trabucchi 1988).

Además, se ha demostrado que determinadas acciones bioquímicas del etanol en el SNC, como la activación del sistema de dopamina mesolímbica (DA) o el sistema opioide, pueden estar mediadas por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L. En este sentido, cabe destacar que la activación de dichos sistemas está vinculada a las acciones estimulantes del etanol y están mediados por el acetaldehído (Foddai, Dosia, Spiga y Marco, 2004; Melis, Enrico, Peana y Diana, 2007; Reddy, Boyadjieva y Sarkar, 1995). Por ello, el acetaldehído podría ser un factor importante en la mediación de los efectos inducidos por el etanol en el flujo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para finalizar, podemos concluir que estas investigaciones sugieren que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo L tienen un papel importante en la mediación de las propiedades estimulantes del etanol.

## 7. Conclusiones

Numerosas investigaciones científicas han estudiado los diferentes mecanismos de acción del etanol, aún así, actualmente no existe un marco teórico al respecto. La explicación a ello parece estar relacionada con la escasa reactividad química de esta droga, lo que conlleva que actúe inespecíficamente en el SNC.

Una de las dianas moleculares del etanol más estudiadas es PKA, la cual es considerada una proteína clave en las respuestas neuroconductuales de dicha droga ya que juega un papel en la transducción de señales al interior de la célula. Por esta razón, para esta revisión se seleccionaron dos investigaciones que estudiaban el rol del  $\text{Ca}^{2+}$  en la modulación de la vía AMPc/PKA como principal mecanismo de acción del etanol, así como los efectos en la estimulación locomotora inducidos por éste.

Por un lado, los datos obtenidos en la primera investigación, la cual estudió el papel de la CaM, revelaron que el pretratamiento con W7 bloqueó los efectos estimulantes del etanol, por lo que podemos afirmar que la CaM desarrolla un papel importante en la acción conductual inducida por el etanol. La segunda investigación, que evaluó el papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, reveló que tanto diltiazem como verapimilo, modificaron la estimulación locomotora inducida por el etanol, sin afectar a la supresión locomotora. Además, los datos obtenidos apuntan a que el etanol es más sensible a este tipo de canales, en comparación con otros fármacos psicoestimulantes.

Para finalizar, podemos asumir que los datos presentados en ambas investigaciones apoyan la importancia de la vía intracelular AMPc/PKA en la conducta locomotora inducida por el etanol.

## 8. Bibliografía

- Alfonso-Loeches, S., y Guerri, C. (2011). Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(1), 19-47.
- Baliño, P., Ledesma, J. C., y Aragon, C. M. (2014). In Vivo Study of Ethanol-Activated Brain Protein Kinase A: Manipulations of Ca<sup>2+</sup> Distribution and Flux. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(3), 629-640.
- Baliño, P., Ledesma, J. C., y Aragon, C. M. (2014). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin on ethanol neurobehavioral effects. *Psychopharmacology*, 231(24), 4611-4621.
- Baliño, P., Pastor, R., y Aragon, C. M. (2010). Participation of L-type calcium channels in ethanol-induced behavioral stimulation and motor incoordination: effects of diltiazem and verapamil. *Behavioural brain research*, 209(2), 196-204.
- Bergamaschi, S., Govoni, S., Rius, R. A., y Trabucchi, M. (1988). Acute ethanol and acetaldehyde administration produce similar effects on L-type calcium channels in rat brain. *Alcohol*, 5(4), 337-340.
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of physiology*, 499(2), 291-306.
- Bolet Astoviza, M., y Socarrás Suárez, M. M. (2003). El alcoholismo, consecuencias y prevención. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.
- Castañeda, R. E., y Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310.
- Chandrasekar, R. (2013). Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Frontiers in molecular neuroscience*, 6, 14.
- Colombo, G., Agabio, R., Lobina, C., Reali, R., Fadda, F., y Gessa, G. L. (1994). Blockade of ethanol discrimination by isradipine. *European journal of pharmacology*, 265(3), 167- 170.
- Conti, A. C., Maas Jr, J. W., Moulder, K. L., Jiang, X., Dave, B. A., Mennerick, S., & Muglia, L. J. (2009). Adenylyl cyclases 1 and 8 initiate a presynaptic homeostatic response to ethanol treatment. *PLoS One*, 4(5), e5697.

- Cortes-Romero, C., Galindo, F., Galicia-Isasmendi, S., y Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista de Neurología*, 52, 665-675.
- Czarnecka, E., y Kubik-Bogucka, E. (1993). Effects of calcium antagonists on central actions of ethanol: comparative studies with nifedipine, verapamil and cinnarizine. *Alcohol and Alcoholism*, 28(6), 649-655.
- Daniell, L. C., y Harris, R. A. (1989). Ethanol and inositol 1, 4, 5-trisphosphate release calcium from separate stores of brain microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250(3), 875-881.
- Dopico, A. M., Widmer, H., Wang, G., Lemos, J. R., y Treistman, S. N. (1999). Rat supraoptic magnocellular neurones show distinct large conductance,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel subtypes in cell bodies versus nerve endings. *The Journal of Physiology*, 519(1), 101- 114.
- Engel, J. A., Fahlke, C., Hulthe, P., Hård, E., Johannessen, K., Snape, B., y Svensson, L. (1988). Biochemical and behavioral evidence for an interaction between ethanol and calcium channel antagonists. *Journal of neural transmission*, 74(3), 181-193.
- Ericson, M., Blomqvist, O., Engel, J. A., y Söderpalm, B. (1998). Voluntary ethanol intake in the rat and the associated accumbal dopamine overflow are blocked by ventral tegmental mecamylamine. *European journal of pharmacology*, 358(3), 189-196.
- Ericson, M., Molander, A., Löf, E., Engel, J. A., y Söderpalm, B. (2003). Ethanol elevates accumbal dopamine levels via indirect activation of ventral tegmental nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of pharmacology*, 467(1), 85-93.
- Fadda, F., Garau, B., Colombo, G., y Gessa, G. L. (1992). Isradipine and Other Calcium Channel Antagonists Attenuate Ethanol Consumption in Ethanol-Preferring Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 16(3), 449-452.
- Fadda, F., y Rossetti, Z. L. (1998). Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 56(4), 385-431.
- Fernández-Belda, F., Plenge-Tellechea, F., Fortea, I., y Soler, F. (1998). La señal bioquímica de calcio. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 13-14, 23-34.
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-

- Foddai, M., Dosia, G., Spiga, S., y Marco, D. (2004). Acetaldehyde increases dopaminergic neuronal activity in the VTA. *Neuropsychopharmacology*, 29(3), 530.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., y Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 533-554.
- Izaguirre, V., y Zavaleta, A. I. (1998). Canales de calcio voltajes dependientes. *Ciencia e Investigación*, 1(1), 49-61.
- Jerlhag, E., Grøtli, M., Luthman, K., Svensson, L., y Engel, J. A. (2006). Role of the subunit composition of central nicotinic acetylcholine receptors for the stimulatory and dopamine-enhancing effects of ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 41(5), 486-493.
- Kumar, S., Porcu, P., Werner, D. F., Matthews, D. B., Diaz-Granados, J. L., Helfand, R. S., y Morrow, A. L. (2009). The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology*, 205(4), 529-564.
- Liang, J., Suryanarayanan, A., Abriam, A., Snyder, B., Olsen, R. W., y Spigelman, I. (2007). Mechanisms of reversible GABAA receptor plasticity after ethanol intoxication. *Journal of Neuroscience*, 27(45), 12367-12377.
- Littleton, J. M., Little, H. J., y Whittington, M. A. (1990). Effects of dihydropyridine calcium channel antagonists in ethanol withdrawal; doses required, stereospecificity and actions of Bay K 8644. *Psychopharmacology*, 100(3), 387-392.
- Locatelli, F. F. (2012). *Participación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) en la formación de la memoria de largo término en Chasmagnathus*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, (2003). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Lovinger, D. M. (1995). Developmental decrease in ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rat neocortical neurons: relation to the actions of ifenprodil. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274(1), 164-172.
- Máiquez, J. E. (2008). *Rutas de señalización celular activadas por receptores nicotínicos y su implicación en la neuroprotección y el dolor*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 2008. Facultad de Farmacología y Terapéutica.
- Medina, R. A. (2013). *Desarrollo de nuevos antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT6 y 5-HT7*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2013. Facultad de Ciencias Químicas.

- Melis, M., Enrico, P., Peana, A. T., y Diana, M. (2007). Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), 2824-2833.
- Menéndez, J. T. (2004). Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70 (1).
- Ministerio de Sanidad, Servicios Social e Igualdad (2015). Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España (680-16-001-3). Recuperado de <http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2016). Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España (680-16-095-1). Recuperado de <http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>.
- Mironov, S. L., y Hermann, A. (1996). Ethanol actions on the mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat hippocampal cells are mediated by protein kinase C. *Brain research*, 714(1), 27-37.
- Naturaleza y turismo. (2017). *Tansporte pasivo a través de membrana*. 17 Mayo, 2017, recuperado de: <https://www.asturnatura.com/articulos/envoltura-celular/membrana-plasmatica-transporte-pasivo.php>.
- Nie, H., Rewal, M., Gill, T. M., Ron, D., y Janak, P. H. (2011). Extrasynaptic  $\delta$ -containing GABAA receptors in the nucleus accumbens dorsomedial shell contribute to alcohol intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(11), 4459-4464.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Estrategia mundial para reducir el uso nocivo del alcohol*. Ginebra: OMS; 2010.
- Organización Mundial de la Salud (2014). *Informe de la situación mundial sobre el alcohol y la salud, 2014*.
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., Fuxe, K. y Changeux, J. P. (1998) Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391, 173-177.
- Quertemont, E., Tambour, S., y Tirelli, E. (2005). The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Progress in neurobiology*, 75(4), 247-274.

- Quertemont, E., y Tambour, S. (2004). Is ethanol a pro-drug? The role of acetaldehyde in the central effects of ethanol. *Trends in pharmacological sciences*, 25(3), 130-134.
- Reddy, B. V., Boyadjieva, N., y Sarkar, D. K. (1995). Effect of Ethanol, Propanol, Butanol, and Catalase Enzyme Blockers on  $\beta$ -Endorphin Secretion from Primary Cultures of Hypothalamic Neurons: Evidence for a Mediator Role of Acetaldehyde in Ethanol Stimulation of  $\beta$ -Endorphin Release. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19(2), 339-344.
- Remiro, P. (2014). *Role of intracellular calcium on ethanol-induced activation of protein kinase A: molecular model and behavioral consequences*. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, 2014. Facultad de ciencias biomédicas.
- Rewal, M., Donahue, R., Gill, T. M., Nie, H., Ron, D., y Janak, P. H. (2012). Alpha4 subunit-containing GABAA receptors in the accumbens shell contribute to the reinforcing effects of alcohol. *Addiction biology*, 17(2), 309-321.
- Sari, Y., Johnson, V.R., y Weedman, J.M. (2011). Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 98, 401-443.
- Smith, B. R., Aragon, C. M., y Amit, Z. (1997). Catalase and the production of brain acetaldehyde: a possible mediator of the psychopharmacological effects of ethanol. *Addiction biology*, 2(3), 277-290.
- Söderpalm, B., Ericson, M., Olausson, P., Blomqvist, O., y Engel, J. A. (2000). Nicotinic mechanisms involved in the dopamine activating and reinforcing properties of ethanol. *Behavioural brain research*, 113(1), 85-96.
- Treistman, S. N., y Martin, G. E. (2009). BK Channels: mediators and models for alcohol tolerance. *Trends in neurosciences*, 32(12), 629-637.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., y Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Current opinion in neurobiology*, 8(3), 321-329.
- Watson, W. P., Homewood, N., y Little, H. J. (1998). Differing acute interactions of ethanol with two structurally related dihydropyridines, nitrendipine and felodipine. *Brain research bulletin*, 47(4), 337-343.



White, J. M., y Smith, A. M. (1992). Modification of the behavioural effects of ethanol by nifedipine.  
*Alcohol and Alcoholism*, 27(2), 137-141.