

Efectos conductuales del consumo espontáneo de alcohol en ratones NRMI bajo estrés discontinuo

Spontaneous alcohol consumption behavior effects on NMRI mice under discontinuous stress

Francisco J. Chacón-Lozán⁴, Douglas García¹, Rafael Bonfante², Damelis Daza³

¹Médico Cirujano. Ph. D. Salud Pública. M. Sc. Salud Pública. Unidad de Investigación en Salud Pública. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. E-mail: dgarcia@ucla.edu.ve

²Médico Cirujano. Post doctorado Electrofisiología Molecular. Ph.D. en Ciencia Mención Farmacología Molecular Unidad de Bioquímica. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. E-mail: reabarca@ucla.edu.ve

³Médico Cirujano. Ph.D. Salud Pública. M. Sc. Salud Pública. Unidad de Investigación en Salud Pública. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. E-mail: ddaza@ucla.edu.ve

⁴Estudiante del 9no semestre de la carrera de medicina. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela. E-mail: franciscojlk@hotmail.com

Recibido: 20/03/2013

Aceptado: 16/06/2013

Resumen

Con el propósito de evaluar los efectos conductuales del consumo espontáneo de alcohol en ratones NRMI bajo estrés continuo, se diseñó un experimento con 4 grupos de investigación: Control (n=21), control-estrés (n=25), alcohol (n=23) y alcohol-estrés (n=31); los cuales posterior a un precondicionamiento, recibieron etanol (10%) y agua *ad libitum* y fueron sometidos a nado forzado a 5°C por 1min tres veces/semana. Posteriormente, se evaluó la actividad locomotora en caja de motilidad, ansiedad en laberintos en cruz y memoria de trabajo en laberinto radial de 8 brazos. Todas las mediciones pre-inducción resultaron iguales; el grupo alcohol-estrés registró un porcentaje significativamente mayor de permanencia en el brazo abierto respecto al cerrado del laberinto en cruz; poca motilidad vertical, y les tomó más tiempo resolver el laberinto radial, en comparación con todos los grupos. La tendencia de los resultados permite afirmar que el estrés potencia las alteraciones conductuales en los animales alcohólicos.

Palabras clave: alcohol, estrés, conducta

Abstract

With the aim to evaluate the effects of spontaneous alcohol consumption on NMRI mice submitted to discontinuous stress. We designed a 4 experimental groups: Control (n=21), control-stress (n=25), Alcohol (n=23) and Alcohol-stress (n=31); with posterior to pre-trials, received ethanol (10%) and water *ad libitum* and were subject of force swimming test at 5°C for 1min three times/week. Succeeding, we evaluate locomotor activity in motility cage, anxiety on cross maze and working memory on 8-arm radial maze. All pre-trials results were same; likewise a significant higher percent of alcohol-stress group remaining more time in open arms than closed at cross maze, vertical hypomotility and displayed expend more time to solve the radial maze, all compared against the others groups. The results that stress behavior potentiate behavior disturbance observed in alcoholic animals.

Key Words: Alcohol, stress, behavior (source: MeSH, NLM)

Introducción

El alcohol étílico es un toxico de alto riesgo cuyo consumo está socialmente aceptado y sus consecuencias son un problema de salud pública.

El consumo voluntario en grandes cantidades de alcohol produce una elevación de las concentraciones de alcohol en sangre, lo que genera tolerancia y dependencia en los animales consumidores¹. La revisión de la literatura evidencia que los animales expuestos a consumo voluntario de alcohol

toleran entre 2,5% a 10% de alcohol modificado su sabor con la incorporación de una solución de sucrosa².

Existen experiencias que demuestran que el consumo de alcohol es inducido por situaciones de estrés, en tal sentido un estudio realizado en la universidad del Norte de Carolina demostró que los animales sometidos a nado forzado incrementaban el consumo de alcohol a la tercera semana de haberse iniciado los eventos estresantes³.

Los modelos animales con un consumo de concentraciones de alcohol superiores a 2,5 gr. desarrollan daño cerebral que afecta su memoria visual, cognitiva y emocional observándose una correlación dosis severidad de la lesión⁴.

En relación con el efecto locomotor, hay evidencias que muestran que los roedores de 3 semanas de edad sometidos al consumo de 2.5% gr. de alcohol aumentan su actividad motora⁵.

En vista de que no hay evidencias locales de los efectos conductuales del consumo espontáneo de alcohol en ratones NMRI publicadas en la literatura, se diseñó un estudio experimental para determinar los efectos del consumo de alcohol sobre la motilidad, la ansiedad y la memoria-aprendizaje.

Se espera que este estudio sirva de base para la realización de estudios moleculares que pongan en evidencias los efectos del alcohol sobre el sistema muscarinico colinérgico.

Metodología

Se diseñó una investigación experimental con modelos animales, ratones NMRI todas hembras, de 3 semanas de nacidos y 40 gramos de peso, obtenidos del Bioterio Central de la UCLA. Se estudiaron un total de 80 ratones los cuales fueron asignados por un procedimiento aleatorio en 4 grupos. Los grupos se identificaron como grupo alcohol, grupo alcohol estrés grupo control y grupo control estrés; separados en jaulas pequeñas de 32.5x33.5x13.5 cm.

Pre-condicionamiento: Para el proceso de preconditionamiento de los ratones al ambiente de laboratorio y a los laberintos se mantuvieron a temperatura, humedad y luminosidad ambiental natural; se alimentaron con Perrarina a libre demanda y tuvieron acceso libre al agua durante esta fase. Para este preconditionamiento se emplearon 30 días.

Finalizado este periodo se procedió a realizar las mediciones preinducción correspondiente a la ansiedad, motilidad y la memoria trabajo. Seguidamente se inicio la inducción del consumo de alcohol para identificar los grados de alcohol tolerables en los animales que formaban parte de los grupos alcohol y alcohol estrés, así como la medición de gramos de alimentos y agua consumida en todos los grupos. Por otra parte se probó la tolerancia al estrés en los grupos control estrés y alcohol estrés. Completada estas etapas se inicio la fase de experimentación. Durante todo el experimento se llevó un control diario de consumo de alimento (50gr), agua (100 cc) y alcohol al 10% (100 cc); así como un control semanal de peso.

Ansiedad: En la medición de la ansiedad se utilizó un laberinto en cruz a 79 cm. de altura; dos de los brazos continuos eran abiertos (sin paredes) y los otros dos brazos continuos cerrados (con paredes de 39.5 cm. de altura). Las dimensiones de cada brazo es 58.5cm x19.5 cm. Para el ensayo se colocaba cada individuo durante un lapso de diez minutos

en el laberinto. Se cuantifico el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y/o cerrados y el número de veces que ingresó el ratón a los dos tipos de brazos. Cada ratón se evaluó por separado.

Motilidad: Para la medición de la motilidad se colocaron los animales en una caja de motilidad de 49.5x49.5 x 30 cm. dividida en cuatro (4) cuadrantes iguales por dos líneas visibles marcadas en el piso. Se contabilizaron los desplazamientos horizontales (movimiento de desplazamiento de un cuadrante a otro), los desplazamientos verticales (cuando el animal levanta sus extremidades anteriores y se sustenta sobre las extremidades posteriores) y los movimientos estereotipados de rascado, esta medición se realizó en un lapso de diez (10) minutos, precedidos por cinco (5) minutos de adaptación en la caja de motilidad. Cada ratón se evaluó por separado.

Memoria de Trabajo: La memoria de trabajo fue ensayada en un laberinto radial de 8 brazos de acuerdo a metodología previamente descrita^{6,7}. Previamente los animales fueron acostumbrados a alimentarse y a deambular libremente en el laberinto por un periodo de 3 días. Al cuarto día se inicia los experimentos colocando el animal en el compartimiento central del laberinto con todas las compuertas cerradas durante 10 segundos, luego las compuertas se abren y se deje libremente entrar al animal a uno de los brazos donde encontrará un recipiente que contiene alimento consistente en un comprimido de comida para roedores, una vez dentro del brazo se cierran todas las compuertas con excepción de la compuerta del brazo visitado. Se permite que el animal consuma la comida y salga hacia el compartimiento central, procediendo a cerrar la compuerta faltante, se espera 10 seg y se repite el procedimiento descrito hasta que el animal visite los 8 brazos y consuma la comida ofrecida. En este protocolo se mide el tiempo y numero de errores cometidos durante la resolución del laberinto. Se considera error cuando el animal ingresa a un brazo previamente visitado.

Inducción de Consumo de Alcohol: Una vez realizadas las mediciones de ansiedad, motilidad y memoria trabajo se procedió a iniciar el proceso de inducción del consumo de alcohol en los ratones, se colocaron en N° de 4 en jaulas de 30x19.5x13.5 cm. Se les dio a tomar cantidades crecientes de alcohol aumentándose cada dos días; se inició con 1% alcanzándose una concentración de 10% de alcohol, ya que por encima de 10% disminuyó el consumo y se registraron muertes en los animales.

A los grupos identificados como alcohol estrés y control estrés, al segundo día de iniciada la inducción, se sometieron a estrés, que consistió en colocarlos en un recipiente con agua a una temperatura de 5° C durante un (1) minuto o menos si el ratón se sumergiera hasta el fondo del recipiente. Este procedimiento se llevó a cabo tres días a la semana (lunes, miércoles y viernes) a la misma hora durante un mes. Esta fase del estudio se llevó a cabo por tres (3) meses. Es importante resaltar que los especímenes que morían durante la

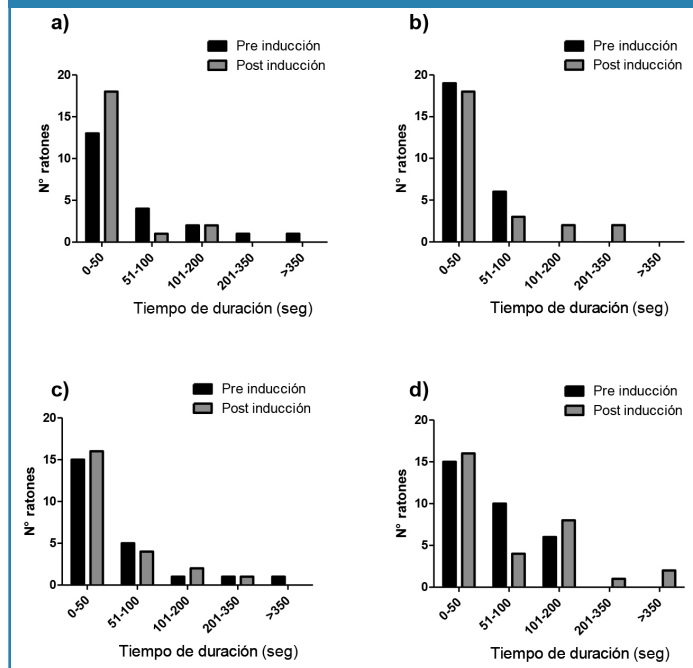
realización del estudio, eran reemplazados debiéndose cumplir con todas las etapas del desarrollo de la investigación. Todos los estudios fueron llevados a cabo en un cuarto antirruido.

Análisis: La información recolectada fue procesada en el paquete estadístico SPSS versión 15.0, los datos se presentaron en Tablas. Previo el análisis de la información se comprobó el tipo de distribución de los datos a través de la prueba Z de Kolmogorov-Smirnov, una vez verificada la no distribución normal de las variables en estudio, se empleó como medida de resumen el porcentaje y como prueba de significancia el test de Kruskal Wallis para la comparación de cuatro grupos independientes.

Resultados

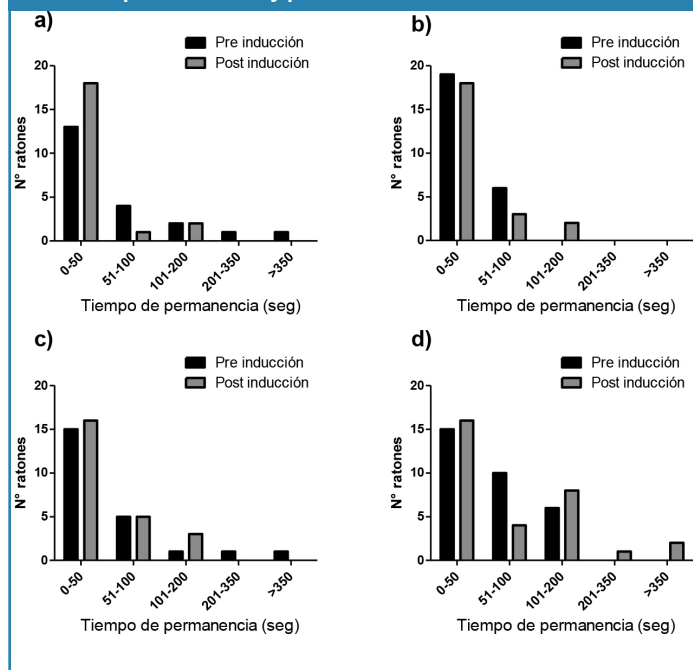
Ansiedad: Entre los hallazgos de esta investigación, se evidenció que al analizar el tiempo de permanencia en el laberinto de brazo abierto que en todos los grupos de estudio la mayoría del los animales se ubicaron en el brazo abierto durante menos 100 segundos, siendo el porcentaje de 87%, al estudiar cada grupo, se observa que en el grupo control 19,1% se ubicó un tiempo mayor a 100 segundos, en el control estrés ningún animal, en el grupo alcohol 12,9% y finalmente en el alcohol estrés se ubicaron el 19,3%. Al realizar el test de Kruskal-Wallis se obtuvo una probabilidad de 0,138 lo que permite afirmar que los grupos eran comparables en este comportamiento al inicio del estudio. Al analizar la fase post-inducción en el laberinto de brazo abierto (**figura 1**), se aprecia que en todos los grupos con excepción del grupo alcohol estrés más del 80% de los animales permanecieron menos de 80 segundos en el brazo abierto. Observándose que en el grupo control solo 9,6% superó una permanencia mayor a 80 segundos, en el grupo control estrés solo el 16%, en el caso del grupo alcohol 13% y alcohol estrés 29%, se encontró diferencias estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis, valor de $p = 0,01$). En cuanto a la medición preinducción del tiempo duración en el brazo cerrado 86% de de los animales permanecieron por más de 500 segundos en los brazos cerrados; siendo inferior en 23,9% de los animales del grupo control, 12,9% de los ratones del grupo alcohol y 20,4% en el grupo alcohol estrés; no se observaron diferencias estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis, valor de $p = 0,409$). Por otra parte al comparar los grupos en el tiempo de duración en el laberinto de brazo cerrado post-inducción (**figura 2**), se aprecia que un 77% permaneció más de 500 segundos en el brazo cerrado, mientras que en el grupo control este porcentaje se ubicó en 90,5%, en el grupo control estrés fue de 76%; en caso de los que consumen alcohol 87% permanecieron en el brazo cerrado por encima de 500 segundos y en el grupo alcohol estrés este porcentaje se ubicó 60,3%. Se encontró diferencias estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis, valor de $p = 0,011$)

Figura 1. Ratones NRMI según grupo y tiempo en brazo abierto medición pre-inducción y post-inducción.



Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Figura 2. Ratones NRMI según grupo y tiempo en brazo cerrado medición pre-inducción y post-inducción.

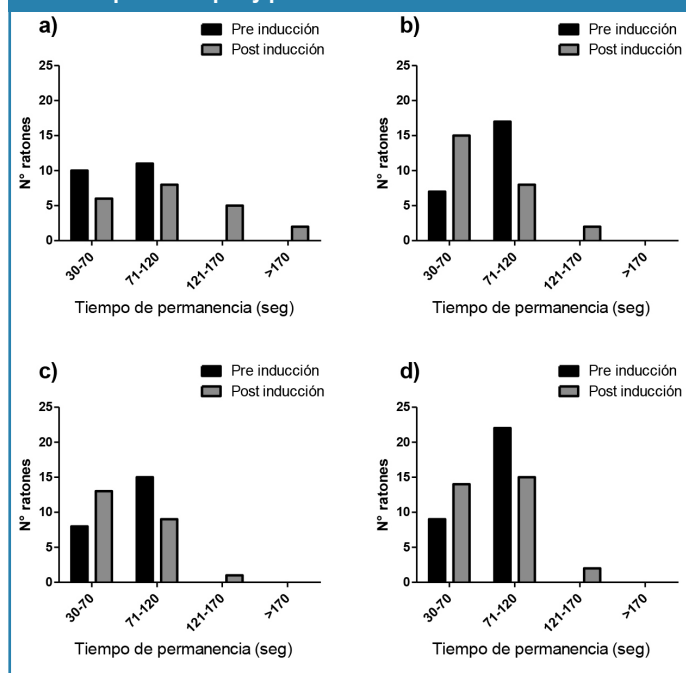


Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Motilidad: Cuando se analizan la motilidad a través de los grupos y los movimientos horizontales estereotipados basales se evidencia un predominio de los animales que durante la observación realizaron más de 60 movimientos horizontales (59%), correspondiendo para el grupo control 47,6%, en el caso del grupo control estrés este porcentaje fue 68%, en los grupos alcohol y alcohol estrés estos porcentajes fueron 47,8% y 67,8% respectivamente, no observándose diferen-

cias estadísticamente significativas ($p = 0,654$). Al explorar la motilidad horizontal post-inducción de los animales (**figura 3**) se observó que 88% de los animales realizaron menos de 122 movimientos horizontales, siendo este porcentaje inferior en el grupo control (66,8%) y superior en el grupo control estrés (92%), alcohol (95,6%) y alcohol estrés (93,6%), obteniéndose un valor de $p = 0,064$. Las alzadas o movimientos verticales en la fase de pre-inducción muestran una mayor ejecución de movimientos en el grupo alcohol y alcohol estrés en los que se registraron hasta 170 movimientos, observándose un valor de $p = 0,993$. En la fase de post-inducción (**figura 4**) de la motilidad se observó una reducción de la motilidad vertical en todos los grupos, 52,4% del grupo control ejecutó entre 72 y 101 movimientos, 52% del grupo control estrés realizó entre 57 y 86 movimientos; en el caso del grupo alcohol 60,9% efectuó entre 72 a 101 y el grupo alcohol estrés 71,1% realizaron entre 42 a 86 movimientos. Se encontró diferencias estadísticamente significativas (test de Kruskal-Wallis, valor de $p = 0,016$)

Figura 3. Ratones NRMI según grupo y movimientos horizontales estereotipados en pre y post inducción.

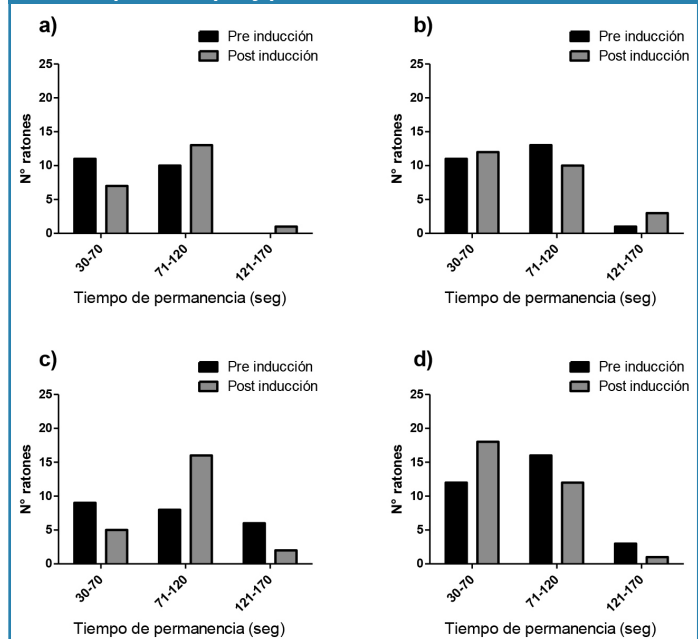


Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Memoria de Trabajo: Al analizar la frecuencia de errores cometidos en la fase de pre-inducción por grupos se observa que los animales al resolver el laberinto 81%, se cometieron entre 1 y 2 errores. El grupo control ejecutó entre 1 y 3 errores; 80% del grupo control estrés y 91,6% del grupo alcohol estrés efectuaron entre 1 y 2 errores, mientras que en el grupo alcohol (78,2%) realizó entre 2 y 3 errores. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p = 0,01$). Cuando se estudia la frecuencia de errores cometidos en la resolución del laberinto post-inducción I (**figura 5**) se evidencia que todos los grupos se ubicaron entre 2 y 3 errores excepto el grupo alcohol estrés que se ubicó entre 1 y 3 errores, estas diferencias son estadísticamente significativa (valor de $p = 0,005$).

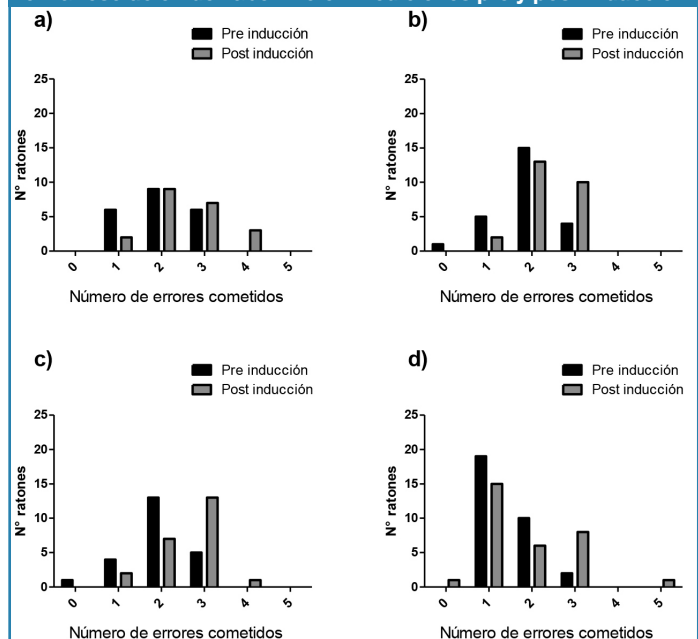
Al comparar en los grupos el tiempo en la resolución del laberinto durante la fase pre-inducción los animales no mostraron diferencias en el tiempo de resolución del laberinto, observándose que en todos los grupos predominaron los animales que resolvieron el laberinto en un tiempo de 238 a 276 minutos. (Valor de $p = 0,173$). En la medición post-inducción del tiempo de resolución (**figura 6**) 59,6% de los animales resolvieron el laberinto entre 233 y 324 segundos; al analizar los grupos, 61,9% del grupo control, 76% del grupo control stress, 65,2% del grupo alcohol y sólo 40% del grupo alcohol stress lo resolvieron en este tiempo, estas diferencias son estadísticamente significativas ($p = 0,01$).

Figura 4. Ratones NRMI según grupo y movimientos verticales estereotipados en pre y post inducción.



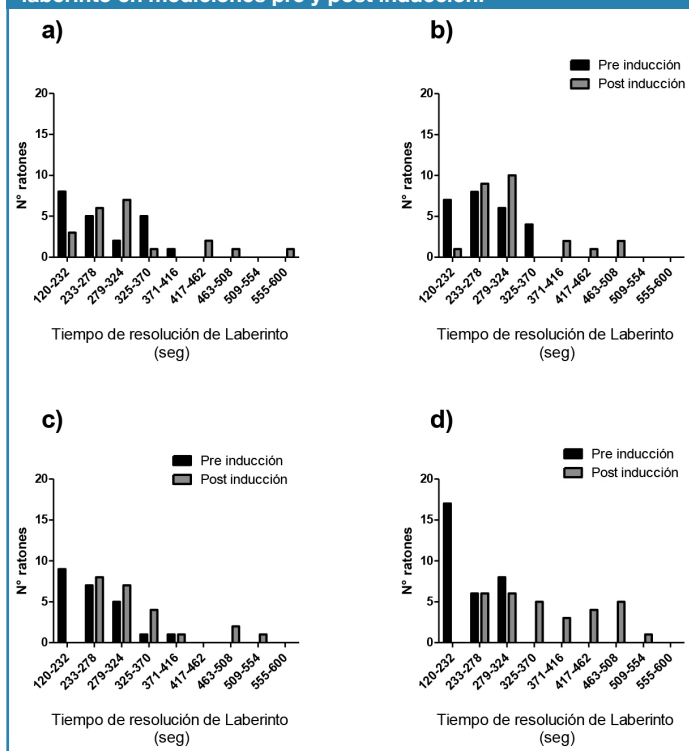
Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Figura 5. Ratones según grupo y frecuencia de errores cometidos en la resolución del laberinto en mediciones pre y post-inducción



Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Figura 6. Ratones según grupo y tiempo en la resolución del laberinto en mediciones pre y post inducción.



Siendo A el grupo control, B el grupo estrés, C el grupo alcohol y D el grupo alcohol-estrés.

Discusión

El consumo de alcohol está ligado al desarrollo histórico de la humanidad, evidenciándose efectos negativos si el consumo es excesivo o efectos positivos si el consumo es moderado⁸. Se sabe que una concentración en sangre de 1% de etanol produce daños severos sobre el sistema nervioso central. El consumo moderado de alcohol está implicado en efectos positivos sobre la conducta como son el placer y la activación, o de efectos negativos como la reducción del stress y la ansiedad⁹. La propiedad ansiolítica del alcohol se considera uno de los factores motivacionales más importante para su consumo, dependencia y adicción¹⁰.

En la presente investigación se estudio el efecto del alcohol y el estrés en animales de experimentación (ratones NRM1) sobre aspectos conductuales tales como la ansiedad, motilidad y memoria.

Entre los hallazgos encontrados en el presente estudio se evidencio que en la fase de pre-inducción en relación con la variable ansiedad todos los grupos eran comparables, a diferencia de la fase de post-inducción donde se observa que el grupo de alcohol estrés (19,3%) permanece mayor tiempo (más de 100 seg.) en el brazo abierto ($p = 0,01$), lo que indica que estos ratones se aventuran preferiblemente por los brazos sin protección, pues se sienten menos inhibidos y menos ansiosos. Estos resultados se corroboran con lo expresado en estudios que indican que el alcohol disminuye el miedo y la inhibición, es decir el componente de evitación en un conflicto de aproximación-evitación¹¹. De igual forma

se encontró durante la permanencia en el brazo cerrado, en el grupo alcohol estrés sólo 60,3% permaneció más de 500 segundo, mientras que este porcentaje fue mayor en el grupo control 90,5%, lo que demuestra lo dicho por estudios previos que indican que el alcohol tiene propiedades ansiolíticas en diferentes paradigmas conductuales¹².

Cuando se analiza la motilidad a través de los movimientos horizontales en la fase de preinducción no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, pues en su mayoría realizaron entre 60 movimientos horizontales. No obstante, en la fase de post-inducción a pesar de que las diferencias encontradas son marginalmente significativas ($p = 0,064$) un alto porcentaje de los ratones de los grupos alcohol (95,6%) y alcohol estrés (93,6%) ejecutaron más de 122 movimiento. Esto pudiera ser explicado debido a que los animales sometidos al consumo de alcohol aumentan su hiperactividad y agresividad por la disminución de los niveles de serótina, efecto que se aprecia en el consumo agudo o crónico de la droga¹³.

En cuanto las alzadas o movimientos verticales en la fase de post.-inducción se observó una reducción de la motilidad vertical en todos los grupo, siendo está reducción (42 a 86 movimientos) mayor en el grupo alcohol estrés ($p = 0,016$), esto pudiera tener su explicación en el hecho de que el alcohol altera la marcha y el equilibrio lo que impediría que el animal se sustenta sobre las extremidades posteriores de una manera adecuada que impida la motilidad vertical.

En la medición post-inducción del tiempo de resolución del laberinto se evidencia que un alto porcentaje de los animales resolvieron el laberinto entre 233 y 324 segundos; no obstante, al comparar los grupos se encontró que solo 40% del grupo alcohol stress lo resolvieron en este tiempo ($p = 0,01$) esto se corrobora con lo encontrado en la literatura donde se expone que el alcohol por su efecto oxidante produce daño sobre la neurona del hipocampo, zona que está involucrada directamente en fenómenos de memoria y aprendizaje. Adicionalmente se puede decir que el alcohol afecta el estado de alerta lo que permite atribuirle el mayor tiempo en la resolución del laberinto en los grupos que consumían alcohol¹⁴.

Referencias

1. Besheer J., Faccidomo S., Grodin J., Hodge C. Regulation of Motivation to Self Administer Ethanol by mGluR5 in Alcohol Preferring Rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2008 Sep; 32(2):209-221.
2. Carnicella S., Kharazia V., Jeanblanc J., Janak P., Ron D. GDNF a Fast Acting Potent Inhibitor of Alcohol Consumption and Relapse. *PNAS* 2008; June, vol. 105 n° 23, 814-819.
3. Lowery E., Sparrow A., Breese G., Knapp D., Thiele T. The CRF-1 Receptor Antagonist, CP-154,526, Attenuates Estrés-induced Increases in Ethanol Consumption by BALB/cJ Mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2008; Feb; 32(2):240-8.
4. Krystal J., Petrakis I., Mason G., Trevisan L., D'Souza D. *N*-methyl-D-aspartate glutamate Receptors and Alcoholism: Reward, De-

pendence, Treatment, and Vulnerability. *Pharmacol Ther.* 2003; 99:79–94.

5. Stevenson R., Besheer J., Hodge W. Comparison of Ethanol Locomotor Sensitization in Adolescent and Adult DBA/2J Mice. *Psychopharmacology*: 2008; 197(3), 361-370.
6. Neese S, La Grange L, Trujillo E, Romero D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern Med.* 2004 Feb 12;4:4.
7. Krazem A, Marighetto A, Higuieret P, Jaffard R. Age-dependent effects of moderate chronic ethanol administration on different forms of memory expression in mice. *Behav Brain Res.* 2003 Dec 17; 147 (1-2):17-29.
8. Kream R., Stefano G. Homeopathic Ethanol. *Med. Sci. Monit.* 2008; 14(9):11-13
9. Uzbay I serotonergic antidepressants and ethanol withdrawal syndrome. A review. *Alcohol and Alcoholism.* 2008 vol. 43 n°1, 15-24.
10. Mustaca A., Kamenetzky G. Alcoholism and Anxiety: Animal Models. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy* 2006, Vol. 6, N° 3, pp. 343-364
11. Gray J., *La psicología del miedo y el estrés.* Buenos Aires: Editorial Labor SA. año 1993
12. AbrAms, K., Kushner, M., Medina, K.I. Y Voight, A. The pharmacologic and expectancy effects of alcohol on social anxiety in individuals with social phobia. *Drug Alcohol Depend.* 2001. 64(2), 219-31
13. Eckardt M. Gessa G. File S. Grant K. Guerri C. Hoffman P. Kalant H. et al. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system *Alcoholism Clinical and Experimental Research.* 2008 Sep; 32(2):209-221
14. Verster J. Duin, V., Volkerts E., Schreuder A., Verbaten M. Alcohol hangover effects on memory functioning and vigilance performance after an evening of binge drinking. *Neuropsychopharmacology.* 2003. Apr;28(4):740-746.