

## El ozono médico sobre el GABA, el glutamato y la aldehído deshidrogenasa 2 cerebral en ratas alcohólicas en abstinencia

María Teresa Díaz-Soto<sup>1\*</sup>, Ángela Fraga-Pérez<sup>2</sup>, Jacqueline Dranguet-Vaillant<sup>1</sup>, María de los Ángeles Bécquer<sup>2</sup>, Mayté Casanova<sup>2</sup>, José Miguel Calderín-Miranda<sup>1</sup>, Olga Sonia León-Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, San Lázaro y L, Habana 10 400, Cuba <sup>2</sup> Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Ave. 27.<sup>a</sup> Esq. 222, San Agustín, La Lisa, La Habana, Cuba.

### ABSTRACT

#### Medical ozone on GABA, glutamate, and brain aldehyde dehydrogenase 2 in abstinent alcoholic rats.

**Introduction.** Alcoholism is a chronic disease produced by the uncontrolled consumption of alcoholic beverages. Alcohol Abstinence Syndrome (AAS) is the clinical expression of the abrupt interruption or decrease of alcohol intake in a patient who has developed physical dependence. During AAS, neuronal imbalance occurs between the neurotransmitters GABA and glutamate that trigger an increase in Reactive Oxygen Species associated with important behavioral disorders. On the other hand, the metabolism of ethanol itself generates the formation of Acetaldehyde, a highly toxic metabolite capable of generating oxidative stress by different mechanisms, under these conditions the activity of the cerebral mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) enzyme is inhibited, which leads to the accumulation of Acetaldehyde and other toxic aldehydes such as Malonyldialdehyde and 3,4 dihydroxyphenylacetaldehyde.

**Objective.** To determine the actions of medical ozone on GABA, Glutamate and cerebral aldehyde dehydrogenase 2 in alcoholic rats during abstinence.

**Materials and methods.** In the model of alcoholism developed in Lewis rats, medical ozone (1mg / kg rectally, 10 sessions, every 24 hours) was applied during the abstinence stage.

**Results.** The activity of the ALDH enzyme was preserved and restored the redox balance at the cerebral level. These results corresponded to a decrease in behavioral disorders related to neuronal imbalance.

**Conclusions.** Pharmacological manipulation of the Gabaergic and glutamatergic receptors showed that even under conditions of neuronal imbalance reinforced by agonists and / or antagonists of these receptors, medical ozone decreased pro-oxidant / antioxidant imbalance and related behavioral disorders (anxiety).

#### Historial del artículo

Recibido: 13 may 2020

Aceptado: 11 sep 2020

Disponible en línea: 1 ene 2021

#### Palabras clave

Abstinencia alcohólica, ozono, aldehído deshidrogenasa, GABA, glutamato, estrés oxidativo

#### Keywords

Alcohol Abstinence, Ozone, Aldehyde Dehydrogenase, GABA, glutamate, oxidative stress.

Copyright © 2021 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

María Teresa Díaz Soto, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, San Lázaro y L, Habana 10 400, Cuba

Tel.: +53 57948238

E-mail: [teresads@ifal.uh.cu](mailto:teresads@ifal.uh.cu)

<https://revistabiomedica.mx>.

## RESUMEN

**Introducción.** El alcoholismo es una enfermedad crónica producida por el consumo incontrolado de bebidas alcohólicas. El Síndrome de Abstinencia Alcohólica (SAA) es la expresión clínica de la interrupción brusca o disminución de la ingesta de alcohol en un paciente que ha desarrollado dependencia física. Durante el SAA se produce un desequilibrio neuronal entre los neurotransmisores GABA y glutamato, que desencadenan un aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) asociado a importantes trastornos conductuales. Por otra parte, el propio metabolismo del etanol genera la formación de acetaldehído, metabolito altamente tóxico capaz de generar estrés oxidativo por diferentes mecanismos. En estas condiciones, la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) mitocondrial del cerebro es inhibida, lo cual conlleva a la acumulación de acetaldehído y otros aldehídos tóxicos como el malonildialdehído y el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído.

**Objetivo.** Determinar las acciones del ozono médico sobre el GABA, el glutamato y la aldehído deshidrogenasa 2 cerebral en ratas alcohólicas en abstinencia.

**Materiales y métodos.** Se aplicó el ozono médico en un modelo de alcoholismo desarrollado en ratas Lewis (1 mg/kg vía rectal, 10 sesiones, cada 24 horas) durante la etapa de abstinencia.

**Resultados.** Se preservó la actividad de la enzima ALDH2 y se restableció el balance redox a nivel cerebral. Estos resultados se asociaron con una disminución de las afectaciones conductuales relacionadas con el desequilibrio neuronal.

**Conclusiones.** La manipulación farmacológica de los receptores gabaérgico y glutamatérgico demostró que, aun en condiciones de desequilibrio neuronal reforzado por agonistas y/o antagonistas de estos receptores, el ozono médico disminuyó el desequilibrio prooxidante/antioxidante y las afectaciones conductuales relacionadas (ansiedad).

## INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es uno de los problemas de la sociedad contemporánea que merece un análisis científico por las disímiles incidencias que propicia, entiéndase factores sociales condicionantes y sus consecuencias (1-3). El alcohol no es solo la drogadicción más generalizada, sino que, además,

abre las puertas para el consumo de otras sustancias (4-6).

Un criterio de diagnóstico para determinar la dependencia alcohólica es la aparición de síntomas del Síndrome de Abstinencia Alcohólica (SAA) cuando su consumo se ha detenido. Estudios experimentales han demostrado las consecuencias del etanol en modelos de inducción del alcoholismo, entre los cuales se puede citar un aumento de la actividad autonómica (anormalidades motoras y posturales) e hiperexcitabilidad del Sistema Nervioso Central (SNC) (hiperactividad sensorial, convulsiones, ansiedad), entre otros (7-9).

Durante el SAA se prolongan los efectos del acetaldehído y de las ERO, que son generados en la etapa del consumo alcohólico. Es necesario enfatizar que, si bien existe un incremento del abuso y dependencia al etanol, las opciones terapéuticas para esta enfermedad son extremadamente limitadas. Actualmente, el tratamiento clínico del SAA abarca el uso de vitaminas del complejo B, benzodiazepinas, inhibidores de la enzima alcohol deshidrogenasa (Disulfiram), antagonistas opioides (Naltrexona y Naloxona), antagonistas de los receptores NMDA (Acamprosato), antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Propranolol), anticonvulsivos (Carbamazepina) y, en caso de *delirium tremens*, neurolépticos (Haloperidol), pero no existe una terapéutica totalmente eficaz para tratar la enfermedad (10-16).

Existen numerosas evidencias científicas de la utilidad clínica del ozono, que se sustentan en los diversos mecanismos de acción por los que actúa. La modulación de los sistemas oxidantes y antioxidantes del organismo es uno de los efectos biológicos fundamentales de la aplicación sistémica de la ozonoterapia; consiste en la normalización del balance entre los niveles de productos de la oxidación y el sistema de defensa antioxidante. La hipótesis de que un agente oxidante como el ozono pueda inducir un efecto antioxidante constituyó un gran reto para los investigadores. En 1998 aparecieron los primeros trabajos experimentales, liderados por investigadores cubanos que dilucidaron el llamado precondicionamiento oxidativo (17).

Numerosos estudios han demostrado que la aplicación médica del ozono constituye una conducta beneficiosa para muchas enfermedades crónicas degenerativas y afecciones orgánicas (diabetes *mellitus*, artritis reumatoide, hernia discal, presencia de convulsiones). Trabajos experimentales y clínicos confirman sus efectos terapéuticos (18). En estudios realizados en modelos de hepatotoxicidad por CCl<sub>4</sub> y en modelos de isquemia/reperfusión hepática, se han evidenciado los efectos pleiotrópicos del ozono, el cual ha restablecido el balance redox y preservado la integridad mitocondrial, lo que se relaciona con la protección de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) hepática (17, 19-26).

Con base en todo lo anterior, nos planteamos los siguientes objetivos:

Determinar los efectos del ozono médico sobre la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial 2 (ALDH2) cerebral y sobre las alteraciones del SNC asociadas a las transmisiones glutamatérgica y gabaérgica en un modelo experimental crónico de abstinencia alcohólica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo de alcoholismo.

#### Caracterización conductual y del estado redox

Todos los procedimientos con los animales se realizaron según lo establecido por la unidad de gestión de la calidad del Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB), que pone en práctica la Directiva UE 2010/63/UE para experimentos con animales. Se utilizaron ratas macho de la línea Lewis, con intervalo de peso entre 250 y 300 g, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). El desarrollo del modelo de SAA fue basado en lo reportado por estudios anteriores (27-29). Los animales se mantuvieron en una habitación climatizada (20±2 °C), expuestos a un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y recibieron agua (grupo Control) o etanol (grupo Etanol) y pienso, ambos de forma controlada en las siguientes cantidades: 60 mL y 45 g, respectivamente.

Se establecieron dos grupos de experimentación:

- Grupo I: Control (n=10)

- Grupo II: Etanol (n=10)

Al grupo tratado con etanol se administraron 60 mL por día de la siguiente forma:

Etanol al 10 % \_\_\_\_\_ durante 2 semanas desde el día 16 hasta el día 30

Etanol al 20 % \_\_\_\_\_ durante 2 semanas desde el día 31 hasta el día 45

Etanol al 30 % \_\_\_\_\_ durante 2 semanas desde el día 46 hasta el día 60

Etanol al 40 % \_\_\_\_\_ durante 2 semanas desde el día 61 hasta el día 75

### Control del consumo de alimento (pienso) y líquido (agua/etanol)

#### Etapas del estudio

La medición del consumo de agua/etanol y de pienso por caja fue realizada (partiendo del día cero) en días alternos a lo largo del estudio (105 días). Una vez registrados estos datos se completó el volumen de agua y los gramos de comida a los valores establecidos, 60 mL y 45 g, respectivamente. Teniendo en cuenta que en este estudio se evaluaron parámetros conductuales que pudieron ser afectados por el consumo de etanol, previamente se sometieron los grupos experimentales a una etapa de entrenamiento o aprendizaje.

#### Etapa de administración de etanol (inducción del alcoholismo)

Los animales fueron ubicados en “cajas hogar” (uno por caja). Al grupo control se administraron 60 mL de agua por día. El grupo etanol se sometió a las condiciones planteadas anteriormente. Al final de esta fase inductiva, se determinaron los niveles de etanol en suero (30).

#### Etapa tolerancia farmacológica

Al grupo tratado con etanol se le suministró *ad libitum* simultáneamente etanol a dos concentraciones, 10 % y 40 %, durante 2 semanas (desde el día 76 hasta el día 90). Esta etapa es de vital importancia, ya que a partir de la preferencia que manifiesten los animales en estudio se comprueba el estado alcoholizado.

#### Etapa abstinencia

Al grupo tratado se le retiró abruptamente el suministro de etanol durante 2 semanas, desde el

día 91 hasta el día 105. El comportamiento de los grupos experimentales, en esta etapa, demuestra la necesidad o no que presentan las ratas alcoholizadas de consumir etanol, lo cual es evaluado mediante ensayos conductuales.

### Estudio del efecto de la ozonoterapia en ratas alcohólicas sobre parámetros conductuales y el estado redox celular

El ozono (O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>) se generó mediante el OZOMED, equipo producido por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (La Habana, Cuba), a partir del oxígeno médico. El ozono constituyó alrededor del 3% de la mezcla O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>. La dosis de O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> en el estudio se seleccionó sobre la base de la empleada en la clínica, teniendo en cuenta el factor de conversión interespecie. Se realizaron 10 administraciones, cada 24 horas, vía rectal. Un volumen de 5 mL fue insuflado a cada animal a la concentración de la mezcla de 50 mg/L, lo que se corresponde a la dosis, según el peso de los animales, de 1 mg/kg.

Para evaluar los efectos del ozono sobre la conducta y sobre el estado redox en el SAA, se desarrolló el modelo desde sus etapas iniciales, para lo cual se siguió la misma estrategia mencionada anteriormente.

### Grupos de tratamiento y dosis empleadas

La descripción de los grupos de tratamiento y las dosis empleadas se recogen en la **Tabla 1**. La selección de estos se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos en estudios precedentes (17, 19-26).

**Tabla 1.** Grupos de tratamiento y dosis empleada

Grupos	Dosis empleadas
Control (agua) (n= 5)	Control (no alcohólico)
ET-OH (n= 5)	Control positivo alcohólico
Ozono+ET-OH (n= 5)	Control positivo alcohólico tratado con O <sub>3</sub> /O <sub>2</sub> , vía rectal, 10 tratamientos, dosis 1mg/kg cada 24 horas
Oxígeno+ET-OH (n= 5)	Control positivo alcohólico tratado con oxígeno

A cada grupo de estudio (5 animales por grupo) se determinaron los parámetros conductuales teniendo en cuenta el sistema de neurotransmisión que fue manipulado (30 min después de haber administrado el fármaco), mediante el Laberinto Elevado en Cruz, lo cual se llevó a cabo después de concluir los tratamientos con ozono y la manipulación farmacológica. Finalizados los tratamientos, se procedió a la determinación de los marcadores bioquímicos en cerebro: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reducido (GHS), hidroperóxidos totales (HT), ON• y malonildialdehído (MDA) y la ALDH2 mitocondrial de cerebro.

### Laberinto Elevado en Cruz (LEC)

Este ensayo está basado en un modelo descrito por Pellow y col., 1985 (31). Este modelo fue propuesto inicialmente para el estudio de efectos ansiolíticos. Consiste en dos brazos abiertos opuestos (20 x 5 cm) y dos cerrados (20 x 5 cm), también opuestos, en forma de cruz. Los brazos abiertos y cerrados están conectados por una plataforma central (5 x 5 cm). La plataforma, las paredes laterales de los brazos cerrados y los pisos de ambos brazos están confeccionados en "plywood". Las paredes de los brazos cerrados tienen una altura de 15 cm. El laberinto está elevado a 50 cm del piso. Se coloca cada animal en el espacio intermedio entre los brazos y se mide el tiempo de permanencia en cada brazo (indicador de presencia o no de ansiedad: a mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos significa menor ansiedad).

### Estudio del estado redox celular en el modelo de alcoholismo

En una etapa posterior se realizaron determinaciones bioquímicas en el cerebro de los animales objeto de estudio.

### Toma y procesamiento de muestras para determinaciones bioquímicas

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Fueron extraídos los cerebros de los animales y estos fueron almacenados a -20°C para posteriores estudios.

### Preparación de homogenado de cerebro

Los homogenados se obtuvieron empleando el homogeneizador de cuchillas (Edmund Bühler



HO4, Alemania), para lo cual se utilizaron 2 g de tejido en 20 ml de buffer sacarosa-Tris-HCl pH=7,4 0,2 M, según se describe en el PNO/TEC/0303. Posteriormente, se centrifugó 10 min, 3000 rpm a 4°C (Sigma Centrifuge 2K15, Reino Unido) (32). El sobrenadante se guardó para la obtención de las fracciones subcelulares y para la determinación de los marcadores de estrés oxidativo.

#### **Evaluación de marcadores de estrés oxidativo**

Fueron determinados varios marcadores de lesión y protección en el grupo ET-OH y el grupo control; al finalizar el período de abstinencia: SOD, CAT, GSH, ON, MDA, HT.

#### **Determinación de la actividad de catalasa (CAT)**

La técnica utilizada fue la referida según Boehringer-Mannheim (33), y su fundamento consiste en la variación de la densidad óptica (D. O.) ( $\lambda=240$  nm) que tiene lugar durante la descomposición del  $H_2O_2$  por la CAT. La actividad enzimática se siguió a 25°C y pH=7,0; se reportó en  $U.L^{-1}.min^{-1}$ .

#### **Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)**

La determinación de la actividad de la SOD se realizó por el método descrito por Yi Sun y col. (34), que emplea Pirogallol, el cual, en medio básico, se autooxida generando en el medio de reacción el radical  $O_2^{\cdot-}$ . De esta forma, la reacción radicalaria se propaga, acelerando la autooxidación del Pirogallol, cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en el medio, como la SOD, inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio, se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de autooxidación del Pirogallol a 25°C y pH 8,2. Los resultados se expresaron como  $U.L^{-1}.min^{-1}$ .

#### **Determinación de glutatión reducido (GSH)**

La concentración de glutatión reducido (GSH) fue determinada según se describe mediante la utilización del reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) (Sigma) a una concentración de 10 mM (35).

#### **Determinación de malonildialdehído (MDA)**

El MDA se midió como indicador de la peroxidación lipídica (POL), utilizando el método colorimétrico que emplea el 1-metil-2-fenil indol, cromógeno reportado por Esterbauer en 1990 (36).

#### **Determinación de hidroperóxidos totales (HT)**

Para la cuantificación de hidroperóxidos totales (ROOH) fue utilizado el kit comercial H2O2-560 proveniente de Bioxytech (Oxis Internacional Inc., Portland, OR, EUA) (37).

#### **Determinación de nitritos y nitratos (ON•)**

La concentración de nitratos/nitritos ( $NO_3^-/NO_2^-$ ) fue determinada, como medida indirecta de la concentración de ON•, mediante el método de Griess (38).

#### **Determinación de ALDH2 mitocondrial de cerebro**

Para la obtención de la fracción mitocondrial de células cerebrales en la medición de la actividad de ALDH2, el homogenado se centrifugó a 900 g por 15 minutos y se obtuvo la pastilla. La pastilla obtenida de este paso se resuspendió en 10 ml de buffer sacarosa-Tris-HCl 0,2M pH 7,4. Posteriormente, se rehomogeneizó a 340 rpm y se centrifugó a 9000 g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 104 000 g por 60 min y el precipitado mitocondrial se lavó dos veces y se resuspendió en 10 ml de la solución tampón, que se utilizó para la determinación de la ALDH2 mitocondrial de cerebro. Se comprobó la pureza de la fracción mitocondrial aislada mediante la determinación de la enzima alcohol deshidrogenasa. Esta enzima fue utilizada como enzima marcadora de la fracción microsomal. Menos del 5 % de la actividad alcohol deshidrogenasa se encontró en la fracción microsomal, indicando una contaminación mínima de enzimas citosólicas (39).

#### **Determinación de proteínas totales**

La concentración de proteínas totales en el homogenado de cerebro fue determinada por el método descrito por Bradford (1976). Este método se basa en la coloración de las proteínas presentes en el medio con el reactivo azul de Coomassie (Sigma), detectable a 595 nm (40).

### Determinación de la actividad de ALDH2

La actividad de la ALDH2 se midió por el aumento de la producción de NADH a 340 nm (41). La mezcla de reacción contenía: 60 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 8,5), 1 mM de NAD<sup>+</sup>, 1 mM de EDTA y las proteínas mitocondriales (0,5 mg/ensayo). La reacción se mantuvo durante 2 min a temperatura ambiente; la reacción enzimática se inició mediante la adición del sustrato (10 mM propionil aldehído). El cambio de absorbancia se registró durante 30 segundos, 1, 2, 3 y 4 minutos para calcular la tasa de producción de NADH. La actividad específica de ALDH2 se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de la reducción de NAD<sup>+</sup> (P) de  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2$  a 340 nm (Merck Index) y 1 unidad representa una reducción de NAD<sup>+</sup> (+ 1 nmol/min/mg de proteína) a temperatura ambiente (42).

### Modulación de la transmisión GABAérgica (43)

Fueron inoculados por vía intraperitoneal 3mg/kg de Bicuculina, 90 minutos antes de la realización del test LEC.

Grupo 5: ETANOL + BICUCULINA

Grupo 6: ETANOL + OXÍGENO + BICUCULINA

Grupo 7: ETANOL + OZONO + BICUCULINA

### Modulación de la transmisión glutamatérgica (44)

Fue inoculado por vía intraperitoneal 1mg/kg de ácido kaínico el último día del estudio experimental (día 98), 30 minutos antes de la realización del test LEC.

Grupo 11: ETANOL + ácido kaínico

Grupo 12: ETANOL + OXÍGENO + ácido kaínico

Grupo 113: ETANOL + OZONO + ácido kaínico

### Procesamiento estadístico

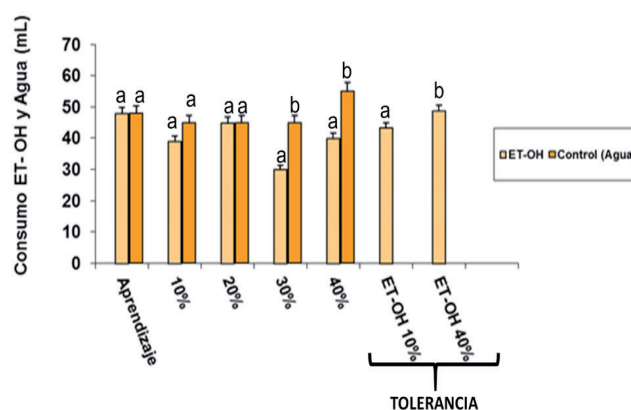
Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a un análisis exploratorio donde se detectaron puntos aberrantes (*outliers*). Además, se estimaron parámetros descriptivos como media y desviación estándar. Para determinar diferencias entre grupos en una variable en cuestión se utilizó un ANOVA de clasificación simple, seguido de un ensayo de comparación de medias (Student-Newman-Keuls) y la prueba t de Student. El nivel empleado de significación estadística, en todos los casos, fue de  $p < 0.05$ . Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico: STATISTICA versión 6.0 para WINDOWS.

## RESULTADOS

### Caracterización del modelo de alcoholismo crónico y abstinencia alcohólica (AA) en ratas Lewis

#### Comportamiento del consumo de líquidos (ET-OH y Agua)

La **Figura 1** muestra el consumo de líquido en los animales objeto de estudio durante las diferentes etapas del desarrollo del modelo, el grupo control que consumió agua y el grupo que ingirió etanol a diferentes concentraciones. A todas las concentraciones en que les fue suministrado el etanol, los animales en estudio consumieron la solución alcohólica, no existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el volumen de solución etanólica (10%-40%) consumido durante la inducción del alcoholismo (56 días). En los resultados de la etapa Tolerancia Farmacológica, en la que se expone al animal a dos concentraciones de etanol (una baja 10% y otra alta 40%), para que consuma la que prefiera, se observó que hubo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en consumo de la solución etílica más concentrada, lo cual indica la preferencia de las ratas en estudio por el etanol.



**Figura 1.** Consumo de etanol o agua. Las ratas ( $n=10$ ) recibieron solución acuosa de etanol como se describe: 10% (1-14 días), 20% (15-28 días), 30% (29-42 días), 40% (43-56 días). Consumo de ET-OH y agua durante la inducción de alcoholismo en ratas. La fase de tolerancia se indica por el volumen de ET-OH (10% o 40%) ingerido por las ratas (2 semanas). Se representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## Bicuculina y ácido kaínico en el LEC

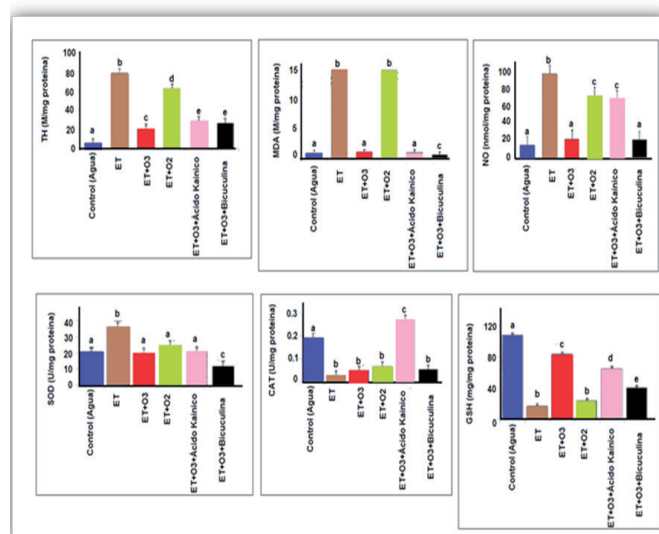
Los grupos ozonizados con o sin manipulación farmacológica manifestaron aumento significativo ( $p<0.05$ ) en el número de entradas en los brazos cerrados y en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos con respecto a los grupos no ozonizados, no hubo diferencias entre estos. La administración de bicuculina y ácido kaínico provocó disminución significativa ( $p<0.05$ ) de los parámetros medidos con respecto al grupo control y a los grupos ozonizados (Tabla 2).

**Tabla 2.** Perfil del estado de ansiedad utilizando el LEC en ratas alcoholizadas, con o sin tratamiento con ozono, manipuladas con bicuculina o ácido kaínico.

Grupos	Tiempo (s) de permanencia brazos cerrados	Tiempo (s) de permanencia brazos abiertos
Agua	6.25±0.81 (a)	118.13±3.00 (b)
Etanol	112.10±0.33 (b)	6.33±1.00 (a)
Etanol+O3	4.31±0.12 (a)	114.21±0.33 (b)
ET+ Bicuculina	122.18±0.10 (b)	7.41±1.21 (a)
Et+O3+Bicuculina	3.15±0.21(a)	100.31±1.80 (b)
ET+ Ácido Kaínico	11.33±0.15 (a)	6.11±1.31 (a)
Et+O3+Ácido Kaínico	2.91±0.22 (a)	99.01±0.83 (b)

Los grupos experimentales se distribuyeron de la siguiente forma: control (agua), grupo etanol, grupo Et-OH + ozono, grupo Et-OH + bicuculina, grupo Et-OH + ozono + bicuculina. Et-OH + ácido kaínico, grupo Et-OH + ozono + ácido kaínico. Se representan la media ± error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos, para cada una de las condiciones experimentales estudiadas.

Los resultados referidos al estado redox después de la manipulación con agonista glutamatérgico (ácido kaínico) y antagonista gabaérgico (bicuculina) se representan en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Evaluación del efecto del ozono en el estado redox en cerebro de ratas alcoholizadas manipuladas con bicuculina o ácido kaínico. Se representan la actividad de las enzimas SOD, CAT y las concentraciones de GSH (indicadores de protección), MDA, HT y óxido nítrico (indicadores de daño). La evaluación se realizó a los grupos experimentales que se distribuyeron de la siguiente forma: control (agua), grupo etanol, grupo Et-OH + ozono, grupo Et-OH + oxígeno, Et-OH + ozono + ácido kaínico, Et-OH + ozono + bicuculina. Se representan la media ± error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos, para cada una de las condiciones experimentales estudiadas.

En los grupos manipulados con bicuculina y ozono se observó una disminución significativa ( $p<0.05$ ) tanto de los marcadores de protección (SOD, CAT, y GSH) como de los de daño (MDA), con respecto al grupo control negativo. En el grupo tratado con ácido kaínico y ozono, se manifestó un comportamiento de la enzima SOD semejante al grupo control. La actividad de la CAT en el grupo ozonizado y tratado con ácido kaínico fue superior significativamente ( $p<0.05$ ) que en el grupo control. Las concentraciones de MDA en el grupo ozonizado tratado con ácido kaínico fueron semejantes al grupo control y menores significativamente que en el grupo etanol ( $p<0.05$ ).

Teniendo en cuenta la importante función de la enzima ALDH2 en el metabolismo del MDA y con base en los resultados anteriormente expuestos, fue determinada la actividad de la enzima en

mitocondrias de cerebro de ratas manipuladas con ácido kaínico y bicuculina (**Tabla 3**). En los grupos tratados con ozono, con o sin manipulación farmacológica, aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad enzimática con respecto a los no ozonizados.

**Tabla 3.** Actividad de la aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial en homogenado de cerebro y los efectos del ácido kaínico y bicuculina en los grupos experimentales.

Grupos experimentales	Sin tratamiento	Tratado con ácido kaínico (1mg/kg)	Tratado con bicuculina (3mg/kg)
Control (Agua)	5.36±0.54(a)	-	-
Etanol	0.31±0.0.15(b)	0.3±0.017	0.17±0.028(#)
Etanol + ozono	3.9±0.96(c)	3.79±0.3	1.73±0.056(\$)
Etanol + oxígeno	0.43±0.055(b) (&)	0.21±0.0.25	0.18±0.025

Cada valor representa la media ± la desviación estándar. Diferentes letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. (#)  $p < 0.05$  del grupo etanol tratado con bicuculina vs tratado con ácido kaínico y sin tratamiento. (\$)  $p < 0.05$  etanol + ozono, tratado con bicuculina vs tratado con ácido kaínico y sin tratamiento. (&)  $p < 0.05$  grupo etanol + oxígeno, sin tratamiento vs tratado con ácido kaínico y tratado con bicuculina.

## DISCUSIÓN

El consumo de etanol a las diferentes concentraciones demostró la tendencia de los grupos experimentales a adquirir la conducta adictiva, lo cual se corroboró con los resultados de la Prueba de Tolerancia Farmacológica, al manifestarse la preferencia por la solución etanólica de mayor concentración. Estos resultados concuerdan con lo planteado por otros autores, quienes afirman “*El consumo crónico genera un progresivo requerimiento de dosis mayores de sustancia para conseguir un efecto similar. La tolerancia puede considerarse un intento del organismo para retornar a la homeostasis, esto es, a las condiciones anteriores al consumo*” (1, 45). Este modelo experimental permite no solo profundizar en los mecanismos de acción terapéutica del agente en cuestión, sino también hace posible ampliar los conocimientos relacionados con la etiopatogenia alcohólica. Por otra parte, los hallazgos científicos

que fundamentan los efectos terapéuticos del ozono, por un mecanismo denominado pre/poscondicionamiento oxidativo, constituyeron la base científica que justifica abordar el estudio de los efectos del ozono sobre la sobreproducción de ERO y las alteraciones de algunas de las funciones básicas del SNC, que se modifican en el sujeto alcohólico.

La ansiedad manifestada por los animales alcoholizados y tratados con bicuculina o ácido kaínico demostró la importancia del desequilibrio neuronal involucrado en este síntoma, coincidiendo con lo planteado por Davis en 2003, al afirmar la disminución de la transmisión GABAérgica como consecuencia del consumo crónico de etanol. La administración del antagonista del GABA refuerza esta condición ya comprobada por los resultados observados en las ratas alcoholizadas sin manipulación farmacológica (46).

Al analizar el comportamiento de las ratas alcohólicas tratadas con bicuculina y ozono en el LEC, se observa una disminución del estado de ansiedad con respecto a los grupos no ozonizados. Los resultados relacionados con el estado redox demostraron que, en todos los grupos en los que se administró el antagonista gabaérgico, existe una disminución de los marcadores de daño (fundamentalmente MDA), pero no un aumento significativo de los marcadores de protección (SOD, CAT y GSH). Sin embargo, estos tampoco disminuyeron debido a que los principales productos que se originarían durante la ozonización de lípidos y proteínas son ozónidos de Criegee, hidroxihidroperóxidos,  $H_2O_2$  y aldehídos. Los ozónidos de Criegee son catabolizados por la enzima glutatión S-transferasa (GST), que utiliza glutatión (GSH) como agente reductor, para generar aldehídos y glutatión disulfuro (GSSG). Los aldehídos son metabolizados por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), que utiliza como cofactor el dinucleótido oxidado de nicotinamida adenina (NAD), o mediante la enzima GST, como ocurre en el caso del 4-hidroxinonenal, que usa el GSH como cofactor. La regeneración del GSH se logra por la acción de la enzima glutatión reductasa



(GR) (47,48). Al analizar los valores indicadores de la ALDH2 (a nivel cerebral) en las ratas tratadas con ozono y bicuculina se aprecia actividad de la enzima encargada de metabolizar el acetaldehído y el MDA. Estos resultados permiten explicar los efectos del ozono médico, que disminuye el estado de ansiedad, mediante la preservación del metabolismo de los dos aldehídos tóxicos presentes en el SAA (MDA y acetaldehído). La disminución del MDA (a pesar de la activación no significativa de los sistemas antioxidantes) en el grupo tratado con ozono y el aumento de la actividad de la ALDH2, presentes en las ratas en las que se había exacerbado la disminución de la transmisión gabaérgica, son indicadores de la importante relación que existe entre el control de trastornos conductuales, la disminución de la POL y el adecuado metabolismo del acetaldehído. Estos resultados concuerdan con otros autores que refieren el papel del acetaldehído en el daño cerebral (49).

Teniendo en cuenta que durante el SAA existe una disminución de la regulación del sistema glutamatérgico, lo que implica un aumento de la ansiedad, y conociendo que el receptor kainato contribuye a potenciar la transmisión excitatoria, en el presente estudio las ratas alcoholizadas fueron “desafiadas” con ácido kaínico (agonista del receptor kainato), lo cual provocó aumento del estado de ansiedad evaluada en el LEC. La administración de ozono disminuyó este trastorno conductual a pesar de la estimulación de la transmisión glutamatérgica. Estos resultados corresponden con los relacionados al estado redox, ya que en las ratas ozonizadas existió aumento de los marcadores de protección y disminución de los marcadores de daño. Fue evaluada la actividad de la ALDH en las ratas manipuladas con ácido kaínico y se observó un aumento de la actividad enzimática. Estos resultados demuestran que, a pesar de ser manipulada farmacológicamente con estimulación de transmisión de glutamato, el poscondicionamiento oxidativo fue capaz de ejercer un control importante del estado de ansiedad, el

restablecimiento del balance redox y la preservación del metabolismo de acetaldehído y MDA.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone un probable mecanismo que sigue el ozono en el SAA, el cual consiste en dos efectos fundamentales:

- 1.- Efecto protector de la actividad de la enzima ALDH2 mitocondrial de cerebro, lo que conduce a un aumento del metabolismo del acetaldehído, MDA y dopamina. Esto implica disminución de la probabilidad de formación de aductos entre el MDA y acetaldehído y disminución del desequilibrio neuronal con un menor daño neuronal y disminución de alteraciones conductuales.
- 2.- Estimulación de mecanismos antioxidantes (SOD, CAT, GHS), lo que implica disminución de ERO, disminución de POL y disminución de MDA, condicionando un menor daño neuronal y disminución de las alteraciones conductuales.

## REFERENCIAS

1. National Institute on Drug Abuse. Las drogas, el cerebro y el comportamiento. La ciencia de la adicción. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Estados Unidos. NIH Publicación No. 15-5605(S). 2014
2. Rebolledo-García D, Granados-Moreno DL, González-Vargas PO. Perspectivas del síndrome de supresión etílica: tratamiento a la mexicana. *Med Int Méx.* 2018 julio-agosto;34(4):582-593. doi: 10.24245/mim.v34i4.2086
3. Freynhagen R, Backonja M. Pregabalin for the treatment of drug and alcohol withdrawal symptoms: A comprehensive review. *CNS Drugs.* 2016; 30:1191-1200. doi: 10.1007/s40263-016-0390-z.
4. Díaz-Soto MT, Calderín-Miranda JM. Síndrome de abstinencia alcohólica: Resultado del estrés oxidativo y desequilibrio neuronal. *Estado del arte. Rev Biomed.* 2020; 31(2):96-107. doi:10.32776/revbiomed.v31i2.779
5. Definición de Alcoholismo OMS. Monografía de página web. Disponible en: <http://informe-alcohol.blogspot.com/2009/04/definicion-de-alcoholismo-oms.html>. [Fecha de acceso 10 de nov 2019].
6. Becker HC. Effects of Alcohol Dependence and Withdrawal on Stress Responsiveness and Alcohol Consumption. *Alcohol Res.* 2012; 34(4):448-458. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860383/>

7. Schmidt KJ, Doshi MR, Holzhausen JM, Natavio A, Cadiz M, Winegardner JE. Treatment of severe alcohol withdrawal. *Ann Pharmacother.* 2016; 50(5):389-401. doi: 10.1177/1060028016629161.
8. Weintraub SJ. Diazepam in the treatment of moderate to severe alcohol withdrawal. *CNS Drugs.* 2017 Feb 31(2): 87-95. doi: 10.1007/s40263-016-0403-y.
9. Brotherton AL, Hamilton EP, Kloss HG, Hammond DA. Propofol for treatment of refractory alcohol withdrawal syndrome: a review of the literature. *Pharmacotherapy.* 2016 Apr; 36(4):433-442. doi: 10.1002/phar.1726.
10. Wong A, Benedict NJ, Armahizer MJ, Kane-Gill SL. Evaluation of adjunctive ketamine to benzodiazepines for management of alcohol withdrawal syndrome. *Ann Pharmacother.* 2015 Jan; 49(1): 14-19. doi: 10.1177/1060028014555859.
11. Liu J, Wang LN. Baclofen for alcohol withdrawal. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017 Aug; 20(8);8:CD008502. doi: 10.1002/14651858.CD008502.pub5.
12. Sen S, Grgurich P, Tulolo A, Smith-Freedman A, Lei Y, Gray A, et al. A symptom-triggered benzodiazepine protocol utilizing SAS and CIWA-Ar scoring for the treatment of alcohol withdrawal syndrome in the critically ill. *Ann Pharmacother.* 2017 Feb; 51(2): 101-10. doi:10.1177/1060028016672036.
13. Barbier E, Tapocik JD, Juergens N, Pitcairn C, Borich A, Schank JR, et al. DNA methylation in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-induced behavior and plasticity. *J Neurosci.* 2015 Apr; 35(15):6153-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4571-14.2015
14. Jesse S, Bräthen G, Ferrara M, Keindi M, Ben-Menachem E, Tenasescu R, et al. Alcohol withdrawal syndrome: mechanisms, manifestations, and management. *Acta Neurol Scand.* 2017 Jan; 135 (1): 4-16. doi: 10.1111/ane.12671.
15. Beg M, Fisher S, Siu D, Rajan S, Troxell L, Liu VX. Treatment of alcohol withdrawal syndrome with and without dexmedetomidine. *Perm J.* 2016 Spring; 20(2):49-53. doi: 10.7812/TPP/15-113.
16. Lucyk SN, Wadowski B, Qian E, Lugassy D, Hoffman RS. Comment: evaluation of adjunctive ketamine to benzodiazepines for management of alcohol withdrawal syndrome. *Ann Pharmacother.* 2015 Mar; 49(3): 370. doi: 10.1177/1060028014567919.
17. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm.* 1998; 7(4): 289-94. doi: 10.1010/0962935989093
18. Biblioteca Mundial de Ozonoterapia de ISCO3. Disponible en: [https://www.zotero.org/groups/46074/isco3\\_ozone/library](https://www.zotero.org/groups/46074/isco3_ozone/library) [Fecha de acceso 12 de septiembre de 2020]
19. Guardia J. La reducción del consumo de alcohol. Un nuevo objetivo en el tratamiento del alcoholismo de baja gravedad. *Adicciones.* 2015; 27(1): 3-7. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289139629001> [en línea] [Fecha de acceso 12 de abril de 2020].
20. Mallok A, Vaillant JD, Soto MT, Viebahn-Hänsler R, Viart Mde L, Pérez AF, et al. Ozone protective effects against PTZ-induced generalized seizures are mediated by reestablishment of cellular redox balance and A1 adenosine receptors. *Neurol Res.* 2015 Mar; 37(3):204-10. doi: 10.1179/1743132814Y.0000000445.
21. Ajamieh HH, Menéndez S, Merino N, Martínez-Sánchez G, Re L, León OS. Ischemic and Ozone Oxidative Preconditionings in the Protection Against Hepatic Ischemic-Reperfusion Injury. *Ozone Sci Eng.* 2003; 25(3):241-250. doi:10.1080/01919510390481568
22. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Re L, et al. Similar Protective Effect of Ischaemic and Ozone Oxidative Preconditioning in Liver Ischaemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Res.* 2002 Apr; 45(4):333-9. doi: 10.1006/phrs.2002.0952
23. Al-Dalain SM, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res.* 2001 Nov;44(5):391-6. doi: 10.1006/phrs.2001.0867
24. Candelario-Jalil E, Al-Dalain SM, León-Fernández OS, Menéndez S, Pérez-Oavison G, Merino N, et al. Oxidative Preconditioning Affords Protection Against Carbon Tetrachloride-Induced Glycogen Depletion and Oxidative Stress in Rats. *J. Appl. Toxicol.* 2001 Jul; 2(4)1: 297-301. doi:10.1002/jat.758
25. León-Fernández OS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menéndez S, Viebahn-Hänsler R, Re L, et al. Ozone Oxidative Preconditioning is Mediated by A1 Adenosine Receptors in a Rat Model of Liver Ischemia/Reperfusion. *Transplant Inter.* 2008 Jan, 21(1): 29-48. doi:10.1111/j.1432-2277.2007.00568.x
26. Martínez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Guiliani A, León OS. Ozone Treatment Reduces Blood Oxidative Stress and Pancreas Damage in a Streptozotocin-Induced Diabetes Model in Rats. *Acta Farm. Bonaerense.* 2005 Jun, 24(4):491-7. [http://www.latamjpharm.org/resumenes/24/4/LAJOP\\_24\\_4\\_1\\_1.pdf](http://www.latamjpharm.org/resumenes/24/4/LAJOP_24_4_1_1.pdf)
27. Kamenetzky GV, Mustaca AE. Modelos Animales para el Estudio del Alcoholismo. *Ter. Psicol.* 2005; 23(1): 65-72. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=785/78523107> [en línea] [fecha de acceso 12 de abril de 2020].
28. Rasmussen D, Milton D, Green S, Puchalski S. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001

- Jul; 25(7):999-1005. doi:10.1111/j.1530-0277.2001.tb02308.x
29. Mustaca A, Kamenetzky G. Alcoholismo y ansiedad: modelos animales. *Int J Psychol Psychol Ther.* 2006; 6(3):343-64. <https://www.ijpsy.com/volumen6/num3/148/alcoholismo-y-ansiedad-modelos-animales-ES.pdf>
30. Smolen A, Marks MJ, Smolen TN, Collins AC. Dose and Route of Administration Alter the Relative Elimination of Ethanol by Long-Sleep and Short-Sleep Mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1986 Mar-Apr;10(2):198-204. doi: 10.1111/j.1530-0277.1986.tb05071.x.
31. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986 Mar; 24(3): 525-9. doi: 10.1016/0091-3057(86)90552-6.
32. Soellner D, Grandys T, Nuñez J. Chronic Prenatal Caffeine Exposure Impairs Novel Object Recognition and Radial Arm Maze Behaviors in Adult Rats. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 14; 205(1): 191–199. doi: 10.1016/j.bbr.2009.08.012
33. Boehringer Mannheim. *Biochemica Information. A revised biochemical reference source. Enzymes for routine (1st edition)*, Germany: Boehringer Mannheim, 1987: 15-16.
34. Sun Y, Oberley L, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988 Mar; 34(3): 497-500. doi:10.1093/clinchem/34.3.497
35. Ecobichon DJ. Glutathione despletion and resynthesis in laboratory animals. *Drug Chem Toxicol.* 1984; 7 (4): 345-55. doi:10.3109/01480548408998263
36. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407–421. doi:10.1016/0076-6879(90)86134-h
37. Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals in Murine Skin Fibroblasts under UVB Irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 Jan; 206(2): 474-9. doi:10.1006/bbrc.1995.1067
38. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Meth. Enzymol.* 1996; 268:142-51. doi: 10.1016/s0076-6879(96)68016-1.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May; 72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
40. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968 Oct 24;25(1):192-205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
41. Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J. Neurosci. Res.* 2010 Feb; 88(3): 630-9. doi:10.1002/jnr.22239
42. Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jekabsons M, Yadava N. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 2007 Nov; 85(15): 3206-12. doi: 10.1002/jnr.21290.
43. Buckett WR. Intravenous bicuculline test in mice: characterisation with GABAergic drugs. *J Pharmacol Meth.* 1981 Jan; 5(1):35–41. doi:10.1016/0160-5402(81)90100-5
44. Läck AK, Christian DT. Chronic ethanol and withdrawal effects on kainate receptor-mediated excitatory neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Alcohol.* 2009 Feb; 43(1): 25–33. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.11.002
45. Buck KJ, Milner LC, Denmark DL, Grant SG, Kozell LB. Discovering genes involved in alcohol dependence and other alcohol responses: role of animal models. *Alcohol Res.* 2012; 34(3):367-374. PMID: 23134054; PMCID: PMC3860408.
46. Davis M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci.* 2003 Jul;28(4):263-74. PMID: 12921221; PMCID: PMC165791.
47. Schwartz A, Nikolaevna-Kontorschikova C, Viktorovich-Malesnnikov O, Martínez-Sánchez G, Re L, Avenerovna-Gribkova I, et al. Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapéuticos e indicaciones. AEPROMO; 2011, 315p. ISBN: 978-84-615-2244-6. <https://aepromo.org/guia-para-el-uso-medico-del-ozono-version-online/>
48. Bocci, Velio. *OZONE A New Medical Drug*; 2005. Edit. Springer
49. Hauser SR, Hedlund PB, Roberts AJ, Sari Y, Bell RL, Engleman EA. The 5-HT7 receptor as a potential target for treating drug and alcohol abuse. *Front Neurosci.* 2015 Jan; 8:448 doi:10.3389/fnins.2014.00448