

Sensibilidad al alcohol y la predisposición a beber

© Ana María Sánchez-Pérez 2000
asperez@itsa.ucsf.edu

RESUMEN

El alcoholismo es, de todos sabido, un problema social grave y muy extendido. El alcohol afecta varios puntos del organismo, pero es su acción en el cerebro lo que decide la predisposición a beber. Determinar las interacciones entre el alcohol y sus dianas moleculares en el cerebro y averiguar cómo esta interacción puede influir en el desarrollo de la adicción son grandes retos de la investigación sobre el alcoholismo. Un trabajo publicado recientemente por un grupo de científicos de la Universidad de San Francisco, responde algunas de estas cuestiones. Este grupo ha utilizado como modelo unos ratones a los que por ingeniería genética se ha eliminado una proteína importante del sistema nervioso. Los autores de este estudio reportan que los animales mutantes (animales carentes de la proteína) no sólo presentan una mayor sensibilidad al alcohol, sino que, además, beben espontáneamente menos que sus compañeros normales. Lo más fascinante es que los autores demuestran a nivel bioquímico la razón de esta hipersensibilidad al alcohol. Y es esta correlación entre comportamiento y bioquímica lo que hace de éste un estudio sumamente interesante, especialmente desde un punto de vista terapéutico, para combatir posibles causas que predisponen al alcoholismo.

ABSTRACT

Alcoholism is a critical, widespread problem. Alcohol affects several places throughout the body, but its effect in the brain is responsible for its addictive action. Determining the interactions between alcohol and

its molecular targets within the brain, and investigating how this interaction could induce the development of addiction are major challenges in alcoholism research. A recent paper published by a group of scientists from the University of California, San Francisco (UCSF) addresses some of these questions. This group has used a mouse model where the mice have been genetically modified to eliminate an important protein in the Central Nervous System. The authors have reported that the mutant animals show greater sensitivity to alcohol than their normal littermates. Interestingly, that observation can be correlated with a reduced ethanol self-administration in the mutant mice when compared with wild type mice. Most important, the authors demonstrate at the biochemical level, the reason of this hypersensitivity. It is precisely this correlation between behavior and biochemistry what makes this paper enormously interesting from a therapeutic point of view, since it opens new ways to fight possible causes that might contribute to the development of alcoholism.

Un poco de Historia

Una de las herramientas más útiles que la Biología Molecular ha aportado a la Ciencia, es la creación de ratones transgénicos y de ratones con una mutación nula o en una expresión más informal, 'knockout'. La utilidad de obtener un organismo con una modificación a nivel genético es enorme, y es, hasta ahora, la única forma de observar el efecto de una proteína, (o su carencia) en el contexto del organismo entero, por ejemplo en comportamiento, o en el desarrollo de enfermedades. En este artículo hablamos de unos ratones a los que por ingeniería genética se eliminó un gen que codifica para la Proteína Quinasa C (siglas PKC, del inglés Protein Kinase C). Este nombre genérico designa a un grupo de proteínas importantes del sistema nervioso. Específicamente, este artículo trata de un miembro de esta familia denominado PKC ϵ .

En el laboratorio del Dr. Robert Messing -Gallo Center, Universidad de California San Francisco (UCSF)- han demostrado que PKC ϵ es mediador de algunos de los efectos importantes que el alcohol ejerce en células nerviosas (Hundle et al., 1995; Roivainen et al., 1995). Además, se ha observado que el alcohol puede también modificar la localización (Gordon et al., 1997) y los niveles o cantidad de PKC η (Messing et al., 1991). Sin embargo, estos efectos eran observados en células, en frascos de cultivo. ¿Cuál sería el efecto del alcohol en un individuo si esta proteína, PKC η está ausente? Esta es, sin duda, una meta importantísima en ciencia: la evaluación del efecto de una mutación en el contexto del organismo

en su totalidad. Y así, en el laboratorio del Dr. Messing, se creó un ratón mutante que carece de PKC η .

¿Cómo se comporta el mutante (o ratón carente) de PKC η ?

Este ratón mutante presenta un comportamiento muy interesante. Las primeras observaciones del comportamiento de estos ratones fueron hechas en el laboratorio del Dr. Clyde Hodge (Gallo Center, UCSF). En su grupo observaron que dando a los ratones la opción entre agua sola, y alcohol, el ratón al que le falta la PKC η bebe significativamente menos alcohol que sus compañeros normales. (Los ratones normales también son llamados en la jerga científica ratones de "tipo silvestre"). En otras palabras, se autoadministra menos, su preferencia hacia esta droga está disminuida respecto a los ratones normales.

Un fenotipo verdaderamente intrigante. Y, ¿por qué?, ¿cuál es la razón de esta diferencia?

En primer lugar había que comprobar que este comportamiento distinto no era debido a diferencias en el "paladar" de estos curiosos animales. Para averiguarlo, en el laboratorio del Dr. Hodge se les sometió a diversas pruebas para medir su sentido del gusto; por sabores dulces (con azúcar) o por sabores amargos (con quinina). En estas pruebas los ratones sin la PKC η no demostraron ninguna diferencia con respecto a los normales. Esto significa que el fenotipo de los ratones carentes de PKC η , es realmente interesante, puesto que el hecho de que tengan una reducida preferencia hacia el alcohol, se debe con toda probabilidad al efecto que el alcohol ejerce sobre estos animales, no a su sabor.

La fase siguiente era averiguar cuál es el efecto del alcohol en ratones mutantes y normales. Para ello se inyectaron idénticas cantidades en ambos. Los resultados fueron muy intrigantes; los animales que carecen de la PKC η demostraron ser más sensibles a los efectos del alcohol, en todas las dosis administradas. A bajas dosis el alcohol provoca euforia, que en ratones se traduce en una hiperactividad locomotora (se mueven más). A altas dosis el alcohol es sedativo, produce sueño. Para medir los efectos sedativos de una droga en ratones, el ensayo más utilizado es el de Pérdida del Reflejo de Incorporación. Este reflejo consiste en que, cuando los ratones son colocados boca arriba, como movimiento reflejo ellos se vuelven de nuevo sobre las cuatro patas (aún cuando no estén completamente despiertos). Si están totalmente sedados, pierden ese reflejo, y permanecen boca

arriba. Cuanto más dura ese estado de Pérdida del Reflejo de Incorporación se infiere que más potente es la droga administrada. Con esta prueba se observó que en los ratones carentes de PKC η altas dosis de alcohol provocan un estado de Pérdida de Incorporación mucho más largo que en los normales.

Estas observaciones demuestran que la carencia de esta enzima (PKC η) predispone a una mayor sensibilidad a los efectos del alcohol, y esto se correlaciona con una menor preferencia por beberlo.

Para eliminar la posibilidad de que estos animales tuvieran un problema en metabolizar el alcohol se midió la concentración de alcohol que tienen en sangre después de inyectarlos. La concentración de alcohol en la sangre a distintos tiempos posteriores a la inyección no difería entre los dos genotipos (normal y mutante). Con esta observación se deduce que el efecto distinto que el alcohol ejerce en estos animales está mediado, con toda probabilidad, por sus sitios de acción en el cerebro. Esto los hace un modelo ideal para estudiar las bases moleculares de los efectos del alcohol en el sistema nervioso central.

Investigando el sitio de acción del alcohol en el cerebro

El etanol es una pequeña molécula que no se digiere en el estómago, con lo que pasa a la sangre directamente. La cantidad que no es metabolizada por el hígado es capaz de traspasar fácilmente la barrera que protege al cerebro - la que evita el paso de muchos compuestos extraños-, ofreciendo así cierta protección a nuestro centro neural. Una vez en el cerebro el etanol tiene muchos sitios de acción (Deitrich et al., 1989), pudiendo afectar diversas moléculas, muchas de las cuales son receptores en las membranas de las células nerviosas. La molécula de etanol puede afectar varios de estos receptores. Uno de ellos, muy estudiado en este respecto, es el receptor del neurotransmisor GABA. En particular, es muy importante el efecto del alcohol sobre un subtipo de estos receptores denominado tipo A, (GABAA.). La función primordial de este receptor es la de inhibir la excitación de las células nerviosas. Por ello, drogas que activan la función de GABAA pueden ejercer efectos sedativos (anestésicos, como el mismo alcohol). Por otra parte, drogas o toxinas que inhiben la función de este receptor pueden provocar convulsiones, debido a una excesiva actividad nerviosa.

Volviendo a nuestro ratón mutante, el Dr. Hodge y su grupo decidieron probar distintos agentes químicos que son conocidos por afectar específicamente a los

receptores de GABAA. En particular, probaron tres de ellos: Muscimol (que proviene del hongo *Muscima amanita*); Diazepam (una benzodiazepina conocida en el mercado como Valium) y Pentobarbital (un barbitúrico). Muscimol se une al receptor GABAA en el mismo sitio que el neurotransmisor GABA, actuando de la misma manera. Las otras dos moléculas se unen al receptor de GABAA en lugares distintos al que ligan GABA o Muscimol. Como resultado de esta unión estas moléculas aumentan la acción de GABA o Muscimol sobre el receptor (Fig.1). Por tanto, se les llama moduladores positivos del receptor. Se debe notar que sólo tienen efecto si GABA (o Muscimol) está presente. Estos compuestos químicos son utilizados como anestésicos y tranquilizantes.

De la misma forma que el alcohol tiene efectos de euforia o sedación dependiendo de la dosis administrada, estas drogas tienen propiedades similares. Cuando distintas concentraciones de Muscimol fueron administradas a estos animales y se midió su actividad locomotora, no se observó ninguna diferencia entre los ratones carentes de PKC η y los normales. Sin embargo, cuando se administró diazepam o pentobarbital el efecto sedativo de estas drogas resultó ser significativamente más potente en los mutantes carentes de PKC η . Tal resultado coincidía con el obtenido al tratar los animales con alcohol. Este fue un descubrimiento fascinante. Estos investigadores habían creado un ratón mutante que presentaba una hipersensibilidad al etanol y a otros agentes químicos específicos de los receptores de GABAA. Estos ratones podían representar un modelo muy útil a la hora de diseñar estrategias para tratar el alcoholismo. Para ello había que averiguar, a nivel molecular, a qué se debían estas diferencias observadas en el comportamiento.

¿A qué se debe la distinta sensibilidad de estos animales en respuesta a estas drogas?

El siguiente paso era averiguar qué ocurre a nivel molecular con los receptores de GABA. Para esto, decidimos medir específicamente la actividad de estos receptores, intentando descubrir diferencias entre ratones mutantes y normales.

¿Cómo se puede medir específicamente la función del receptor de GABA, tipo A?. El receptor de GABA es un canal de iones de Cloro que se activa al unirse el ligando (GABA). Al activarse, el canal se abre, haciendo entrar iones de Cloro al interior de la célula (Fig.1).

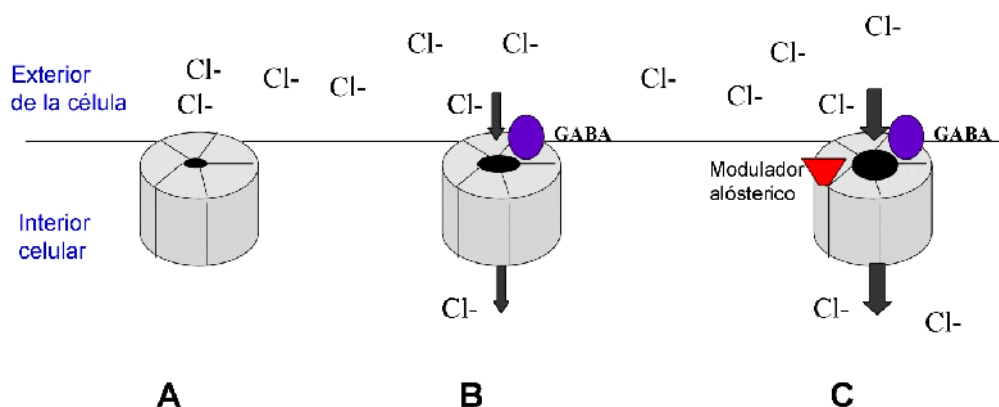


Figura 1. En este esquema se representa un receptor de GABA de tipo A. A; Cerrado. B; En presencia de ligando GABA, el canal de iones se abre, dejando entrar Cl^- al interior de la célula. C; Cuando además de GABA hay otros moduladores positivos que se unen al receptor, la entrada de iones Cl^- es mayor

Por tanto, si conseguimos medir la cantidad de Cloro que entra por ese canal estamos midiendo la actividad de dicho receptor. Este ensayo se denomina Medida del Flujo de Cloro. El primer laboratorio en poner a punto este ensayo fue el del Dr. Adron Harris, en Texas (Allan & Harris, 1987; Allan et al., 1988). En la Figura 2 se esquematiza esta técnica. Partiendo de un lisado (una masa de tejido cuyas células han sido destruidas) de tejido cerebral, las membranas celulares tienden a circularizarse, formando lo que llamamos "microsacos". Estos microsacos tendrán, obviamente, receptores de GABA en su membrana. Incubando esta preparación con un exceso de iones de Cloro radioactivo y Muscimol, se abrirá el canal y el Cloro entrará a los microsacos. Después de filtrar esta preparación, se lava el exceso de Cloro, y, finalmente, se mide la radioactividad incorporada en los microsacos que han sido separados del resto del tejido por filtración. Esta radioactividad será una medida directa de la actividad del receptor presente en los microsacos.

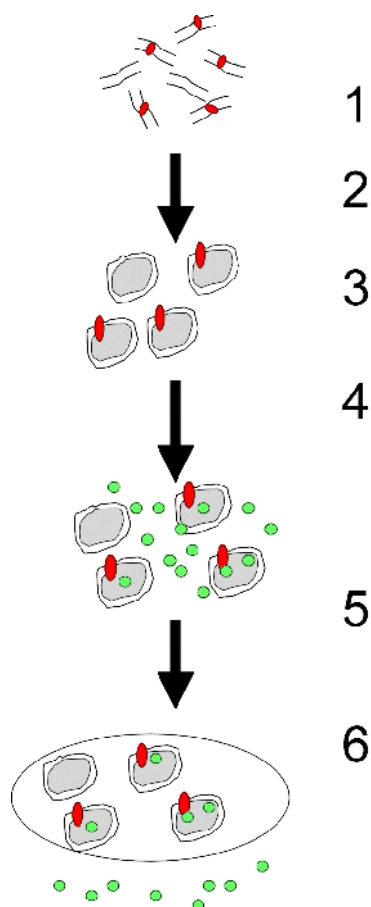


Figura 2. Esquema de la técnica de flujo de Cloro.

1.- Lisado de tejido cerebral. Las membranas son lisadas sin detergentes.

2.- Incubación en hielo

3.- Las membranas se recirculan espontáneamente

4.- Incubación con Cloro radiactivo, en presencia de ligandos que abrirán el receptor GABA.

5.- Las membranas se filtran, lavando así toda radioactividad que no entró en los microsacos.

6.- Finalmente medimos la radioactividad retenida en el filtro. Cuanto más activo es el receptor de GABAA más radioactividad detectaremos.

Un receptor muy sensible

En la Figura 3 se expresa gráficamente la cantidad de Cloro que queda retenida en los microsacos mutantes (diamantes) y en la de los normales (cuadrados) en respuesta a distintas dosis de Muscimol. Como se ve, las líneas coinciden, indicando que la actividad de los receptores no difiere entre ambos.

Sin embargo, si añadimos alcohol o flunitrazepam (una benzodiazepina) al Muscimol la cantidad de cloro retenida en los microsacos procedentes de ratones mutantes es mucho mayor que en los microsacos de ratones normales. Esto indica que el receptor "mutante" es mucho más sensible a ser activado por alcohol y flunitrazepam (Fig. 4).

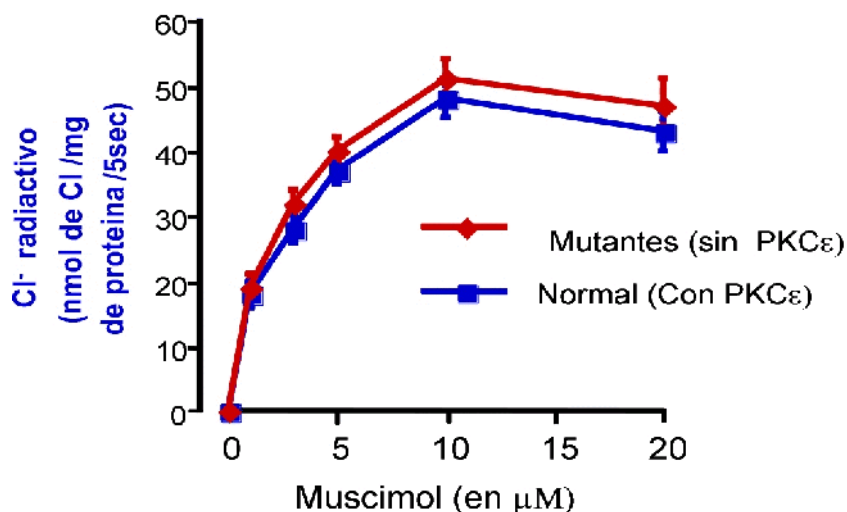


Figura 3. En esta gráfica se muestra la entrada de Cloro respuesta a distintas concentraciones de Muscimol.

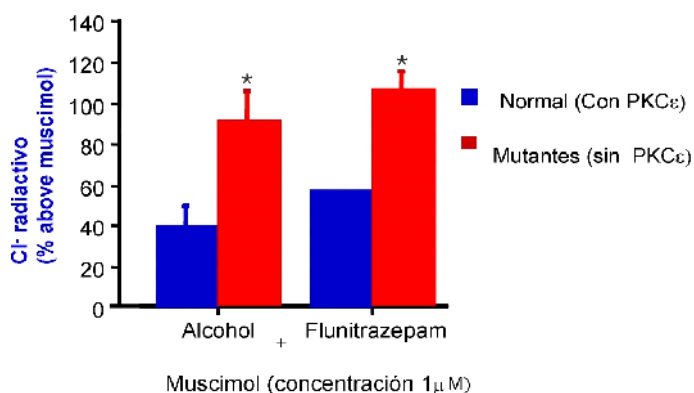


Figura 4 . La entrada de cloro en los microsacos procedentes de ratones mutantes (rojo) es significativamente mayor que en los normales (azul), cuando se añade alcohol o flunitrazepam a la preparación.

Estos resultados se correlacionan perfectamente con los obtenidos estudiando el comportamiento del animal. El muscimol solo no produjo efectos diferentes en los ratones mutantes respecto a los de tipo silvestre; tampoco la actividad del receptor de GABAA es diferente en respuesta al Muscimol. Sin embargo,

cuando inyectamos ciertos sedativos (Valium y alcohol) el ratón mutante es hipersensible y duerme mucho más tiempo, y al mismo tiempo sus receptores GABAA son hiperactivos en respuesta a estas drogas.

Finalmente, había que comprobar que estas diferencias en la respuesta del receptor de GABAA no eran debidas a un problema durante el crecimiento del ratón (hay que tener en cuenta que un ratón con una mutación nula, o transgénico, presenta el defecto desde la primera división celular, y, por lo tanto, durante todo el desarrollo desde el embrión). Para ello, repetimos el mismo ensayo de entrada de Cloro radioactivo, pero esta vez añadiendo en la preparación un inhibidor absolutamente específico de PKC ϵ (un generoso regalo de la Dra. Daria Mochly-Rosen; Johnson et al., 1996). El resultado, expresado en la Fig.5, demuestra que el inhibidor tiene el mismo efecto que la falta absoluta de la proteína, es decir, aumenta la entrada de Cloro a los microsacos - exactamente lo que ocurría en los microsacos procedentes de ratones mutantes-. Así, quedó sólidamente demostrado que las diferencias en las respuestas de los receptores de GABAA se debía únicamente a la falta de PKC ϵ .

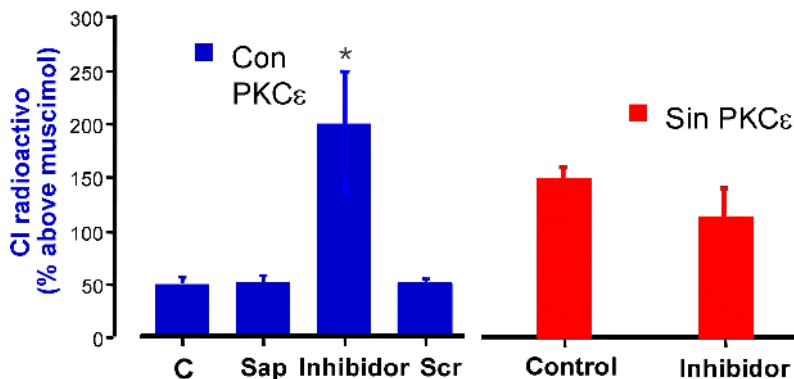


Figura 5. En azul se representa la respuesta de los microsacos de ratón normal, C es el control, Sap, es el agente que permeabiliza los microsacos, (como se ve no tiene ningún efecto), Inhibidor es el agente que específicamente inhibe la PKC ϵ . Como se ve, la entrada de Cloro aumenta considerablemente, a un nivel comparable a los microsacos de ratón mutante (en rojo)

Conclusión

Las repercusiones de este descubrimiento son interesantes y muy prometedoras desde el punto de vista de diseñar tratamientos contra el alcoholismo. He aquí

un animal que, careciendo de una proteína, es prácticamente normal, pero, presenta una característica particular hacia el alcohol: bebe menos. Este animal abre una nueva vía de investigación contra el alcoholismo, puesto que demuestra que una alteración molecular, puede modificar drásticamente el comportamiento. Estas investigaciones pueden desarrollarse para dar lugar a un tratamiento que reduzca la propensión a beber y, consecuentemente, el alcoholismo.

El alcoholismo se desarrolla por diversas causas, y la investigación al respecto está avanzando rápidamente, pero aún queda mucho camino por recorrer. En estos momentos no se pueden establecer las causas moleculares del alcoholismo, y posiblemente no hay pocas, sino cientos. Este estudio representa un pequeño aporte en este camino, una posible vía o mecanismo, que puede ayudar a una población importante de individuos. Como en muchas terapias existentes en la actualidad contra diversas enfermedades, no existe una panacea, porque no sólo hay diversos caminos biológicos, también hay muchas diferencias entre individuos. En particular, este trabajo estudia la correlación entre sensibilidad hacia una droga y la autoadministración de la misma. Modular la PKC η puede ayudar a un individuo a beber menos, porque siente los efectos del alcohol antes. En el proceso de la adicción hay varios pasos. Al principio se bebe porque el alcohol tiene ciertos efectos placenteros. Si la exposición a la droga es continuada y la dosis es alta, hay consiguientes cambios moleculares en el cerebro que determinan el estado dependiente o de adicción. Adicción, entre otras características, se define por el síndrome de abstinencia. Si un individuo bebe voluntariamente menos (porque nota los efectos antes, o más intensamente), el resultado es que la dosis de droga que ingiere es menor, por tanto el proceso hacia la adicción aminora. Este factor puede ayudar, y por ello puede utilizarse como terapia contra la adicción.

En el mercado existen algunos tratamientos, contra el alcoholismo, como la Naltrexona. El mecanismo de acción de la misma implica una reducción del efecto placentero del alcohol, y como consecuencia el individuo bebe menos. No es una solución definitiva al problema, pero puede ayudar. Todas estas terapias son importantes, y en conjunto pueden ayudar a la población a reducir la ingesta de alcohol, y posiblemente la adicción.

Puntos de interés

- Neurociencia en la Internet (Neuroscience on the Internet):
<http://www.neuroguide.com/>
- Instituto Nacional del abuso de drogas y alcohol -Universidad de California en San Francisco (University of California San Francisco):
<http://www.ucsf.edu/>
- Centro para la Neurobiología de la Adicción (Center for the Neurobiology of Addiction): <http://www.ucsf.edu/~cnba/>
- Biblioteca virtual de Neurociencia (World Wide Web Virtual Library: Neuroscience): <http://neuro.med.cornell.edu/VL/>
- Centro para el estudio del alcoholismo Ernest Gallo (Ernest Gallo Clinic and Research Center): <http://gallo.ucsf.edu/>

Glosario

Transgénico: animal al que, por ingeniería genética, se le ha añadido a su genoma un gen foráneo. Todas y cada una de las células de este animal creado por ingeniería genética expresarán la proteína de interés. Un animal con una mutación nula, o knockout, es un animal en el que se ha eliminado un gen o una parte crucial para la expresión funcional de un gen. El resultado es la falta absoluta de una proteína particular en el animal entero. Joyner (1995) es un libro práctico donde se explican las técnicas para crear ratones transgénicos y mutantes.

Proteínas Quinasa C (PKC): Enzima que fosforila (es decir añaden un grupo fosfato) a otras proteínas en aminoácidos particulares (serinas o treoninas). Esta modificación resulta en una modulación en la actividad de la proteína que es fosforilada. Dentro de esta nomenclatura general, PKC, se agrupan 11 variantes o isoformas. Los miembros dentro de la familia de PKCs son denominados por letras griegas (α , β , δ , ϵ , γ , ... y todas reconocen y fosforilan la misma secuencia en la proteína sustrato. Previamente se las consideraba a todas en su conjunto, como si fuesen una misma enzima. Sin embargo, el avance de estudios genéticos está demostrando que las diversas PKCs presentan importantes diferencias en su regulación, expresión y funcionamiento (cómo, dónde y cuál es su acción). Un buen artículo revisión sobre ellas es (Tanaka & Nishizuka, 1994).

Fenotipo: término que designa la apariencia o comportamiento de un individuo en un ambiente dado con respecto a una característica heredada.

Genotipo: la constitución genética de este individuo.

Receptores: proteínas de diversa estructura y complejidad que, con algunas excepciones, residen en la membrana celular. Estas proteínas tienen dominios (partes) fuera de la célula, dominios transmembrana y dominios dentro de la célula, de forma que pueden "sentir" cambios en el exterior y comunicarlos al interior. En las células nerviosas hay muchos tipos de receptores que 'reciben' distintos tipos de moléculas (ligandos o agonistas), entre los cuales se encuentran los receptores de los neurotransmisores. Una vez se ha producido la unión entre el agonista (por ej., un neurotransmisor) y el receptor, se desencadenarán una serie de cambios bioquímicos y/o físicos que dan lugar a los complejos mecanismos de funcionamiento de las células nerviosas.

GABA: aminoácido modificado y cuyas letras en inglés significan gamma-amino butiric acid (ácido gamma-amino butírico). Es sintetizado en las células nerviosas a partir de otro aminoácido (ácido Glutámico). Las neuronas que sintetizan GABA lo secretan al espacio entre neuronas y allí podrá acceder y unirse a receptores (receptores de GABA) presentes en las membranas de células neuronales vecinas. Así pues es un neurotransmisor, porque transmite señales entre neuronas.

Referencias

- Allan, A. M., and Harris, R. A. (1987). Acute and chronic ethanol treatments alter GABA receptor-operated chloride channels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 27: 665-670.
- Allan, A. M., Spuhler, K. P., and Harris, R. A. (1988). Gamma-aminobutyric acid-activated chloride channels: relationship to genetic differences in ethanol sensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 866-870.
- Gordon, A., Yao, L., Wu, Z., Coe, I., and Diamond, I. (1997). Ethanol alters the subcellular localization of delta and epsilon protein kinase C in NG108-15 cells. *Molecular Pharmacology* 52: 554-559.
- Hodge, C., Mehmert, K., Kelley, S., McMahon, T., Haywood, A., Olive, M., Wang, D., Sanchez-Perez, A., and Messing, R. (1999). Reduced ethanol consumption and increased GABAergic sensitivity in PKC η mutant mice. *Nature Neuroscience* 2: 997-1002.

- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., and Messing, R. (1995). Overexpression of ϵ -PKC protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol. Chem.* 270: 30134-30140.
- Johnson, J., Gray, M., Chen, C.-H., and Mochly-Rosen, D. (1996). A protein kinase C inhibitor as isozyme-specific antagonist of cardiac function. *J. Biol. Chem.* 271: 24962-24966.
- Messing, R., Petersen, P., and Henrich, C. (1991). Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C δ and ϵ and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neuronal cells. *J of Biol. Chem.* 266: 23428-23432.
- Roivainen, R., Hundle, B., and Messing, R. (1995). Ethanol enhances growth factor activation of mitogen-activated protein kinases by a protein kinase C-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1891-1895.
- Tanaka, C., and Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 551-567.

Ana María Sánchez-Pérez es licenciada en Bioquímica por la Facultad de Ciencias Biológicas, Burjassot, Valencia (España). Título de Master (Departamento de Patología) y título de Doctorado (Departamento de Bioquímica) obtenido por la Universidad de Bristol, Inglaterra. En la actualidad está en su tercer año de postdoctorado en la Universidad de California, San Francisco. Nueva dirección a partir de Junio del 2000: Universidad de Padova (Italia).