

# Modificaciones calcio dependiente de radicales libres en sinaptosomas de corteza frontal de ratón por la ingesta crónica de alcohol

María Dolores Mayas<sup>1</sup>, María Jesús Ramírez-Expósito<sup>2</sup>, Manuela Cobo<sup>3</sup>,  
Bernardo Camacho<sup>3</sup>, María Jesús García<sup>4</sup>, Pilar Carrera<sup>5</sup>,  
José Manuel Martínez-Martos<sup>2</sup>

## RESUMEN

El presente trabajo analiza los efectos del consumo crónico de etanol sobre diferentes parámetros que inducen estrés oxidativo y sobre el comportamiento bioenergético de los sinaptosomas; ya que es bien conocido que el consumo excesivo o crónico de alcohol se asocia a diferentes procesos degenerativos e inflamatorios en el sistema nervioso central (SNC), además de producir un efecto depresor sobre diferentes centros nerviosos inhibidores. Esto puede ser debido al aumento de fluidez en las membranas y/o a cambios en la función de las proteínas que se insertan en ellas. *Material y métodos:* se determinan la formación de radicales libres, el nivel de peroxidación lipídica y el grado de oxidación de proteínas como índices del estrés oxidativo, y la actividad mitocondrial como índice del comportamiento bioenergético en sinaptosomas de corteza frontal de ratones controles y ratones que tomaron

Recibido: 4 mayo 2006 Aceptado: 25 abril 2006

etanol, en situaciones basales y despolarizantes ( $K^+$  25 mM), en presencia o ausencia de calcio en el medio. *Resultados:* se observó un incremento en la formación de radicales libres tras la ingesta de etanol en presencia de calcio en el medio, que no se relacionó con incrementos en los niveles de peroxidación lipídica ni con oxidación protéica. Tampoco se encontró relación entre la actividad mitocondrial y la formación de radicales libres, como había sido observado en estudios previos, realizados *in vitro*. *Conclusión.* el presente estudio demuestra que la ingesta *in vivo* de alcohol provoca alteración en los que el Ca parece ser un factor determinante.

**Palabras clave:** sinaptosomas, peroxidación lipídica, oxidación protéica, radicales libres.

## CALCIUM-DEPENDENT MODULATION OF FREE RADICALS VALUES IN MICE IS FRONTAL CORTEX SYNAPTOSONES BY CHONICAL ALCOHOL INTAKE

## ABSTRACT

The aim of this work is to study the effects of chronic ethanol intake on several parameters which promote oxidative stress and modify bioenergetic behaviour. It is well known that both acute and chronic ethanol intake induce a variety of neurological damages on the central nervous system and produce a depressor effect on several inhibitory nervous centers. This can be due to

<sup>1</sup>Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS, Hospital Carlos Haya, Málaga, España. <sup>2</sup>Área de Fisiología, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad de Jaén, España. <sup>3</sup>Servicio de Neurología, Complejo Hospitalario de Jaén, España. <sup>4</sup>Laboratorio Central de Sanidad Animal, Santafé, Granada, España. <sup>5</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultad de Medicina, Oviedo, España. Correspondencia: María Dolores Mayas Torres. Laboratorio de Medicina Regenerativa, Fundación IMABIS. Hospital Carlos Haya; Pabellón de Gobierno, Planta Sótano. Avenida Carlos Haya 82, E-29010, Málaga, España. Email: mariad.mayas.exts@juntadeandalucia.es

the high membrane fluidity or changes in the function of membrane-bound proteins. *Material and methods*: free radical generation, lipid peroxidation and oxidation of sinaptosomal proteins, as an index of oxidative stress, and the mitochondrial activity, as an index of bioenergetic behaviour, were determined in frontal cortex synaptosomes of control and ethanol-fed mice, under K<sup>+</sup> basal and depolarized conditions, in the presence or absence of calcium. *Results*: an increase in free radicals generation is observed after ethanol intake in presence of calcium; and this is not associated to an increase in lipid peroxidation or protein oxidation levels. There is no relation between free radicals generation and mitochondrial activity. Previous *in vitro* assays carried out in our laboratory showed a relation between free radical generation and mitochondrial activity. *Conclusions*: this work shows that ethanol intake produces toxicity signs that are related to the alteration of several oxidative stress parameters, and these oxidative stress values seem to be modified by a calcium-dependent mechanism, where high calcium levels could be the significant responsible.

**Key words:** synaptosomes, lipid peroxidation, protein oxidation, free radicals.

**E**l alcohol etílico o etanol (EtOH) es la sustancia psicoactiva más utilizada en el mundo después de la cafeína. Su consumo excesivo o crónico está asociado a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios en el SNC, además de provocar un efecto depresor sobre diversos centros nerviosos inhibidores<sup>1-6</sup>. Esto ha dado lugar a la búsqueda de métodos para tratar la dependencia al alcohol. Muchos estudios se centran en los efectos del alcohol para modificar la fluidez de las membranas y alterar la función de las proteínas que se insertan en ellas<sup>7-11</sup> y otros en el papel de las rutas neuroquímicas y los neurotransmisores implicados en esta adicción<sup>5,12-16</sup>. Sin embargo, no se conoce bien como actúa el alcohol a nivel del SNC, ni la naturaleza exacta del alcoholismo como proceso patológico.

Los sinaptosomas se han utilizado para comprender los mecanismos neuroquímicos que subyacen a las funciones cerebrales, incluyendo la liberación y recaptación de neurotransmisores<sup>17-20</sup>, la homeostasis del calcio libre intracelular<sup>21-22</sup>, los estudios de segundos mensajeros o proteínas<sup>23</sup> y el metabolismo energético<sup>24-25</sup>. Estos estudios incluyen las variaciones del estado funcional de esta fracción subcelular dependiendo de su despolarización con K<sup>+</sup> o su activación con diferentes sustancias<sup>26</sup>. Además, muchos estudios

describen el estado metabólico de las mitocondrias sinaptosomales de roedores como un factor clave en disfunciones cerebrales diferentes tales como formación de especies reactivas de oxígeno peroxidación de lípidos de membrana<sup>27</sup>, envejecimiento<sup>28</sup>, neurotoxicidad inducida por drogas<sup>29</sup>, intoxicación crónica<sup>30</sup> e isquemia<sup>31</sup>. Parámetros tales como: la formación de radicales libres de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés: *thiobarbituric acid reactive substances*), el índice de los niveles de peroxidación lipídica, el contenido en grupos carbonilo de las proteínas y el índice de la oxidación proteica informan sobre los niveles de estrés oxidativo<sup>32</sup>. El índice del estado funcional y de comportamiento energético de sinaptosomas de corteza cerebral de roedores, así como la de proliferación celular y la citotoxicidad, se miden utilizando la sal bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT)<sup>26</sup>.

El presente trabajo evalúa en la formación de radicales libres, de TBARS, el contenido de grupos carbonilo de las proteínas y la actividad mitocondrial, sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y depolarizantes, en presencia o ausencia de calcio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En los experimentos realizados en este estudio se han utilizado 78 ratones macho de la variedad Balb/C, con un peso medio de 28.9±6.1 g. Los animales fueron proporcionados por el estabulario de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén y estuvieron acondicionados con un fotoperíodo día/noche de 12 horas, y condiciones constantes de temperatura (20-25°C). Se dividieron de forma aleatoria en dos grupos. Un grupo recibió una solución de EtOH al 15% durante 30 días y el otro grupo fue considerado como control. Los animales dispusieron de comida y bebida *ad libitum*. Los protocolos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa 86/609/CEE de la Comunidad Europea.

### Obtención de la fracción de sinaptosomas

La fracción de sinaptosomas se obtuvo siguiendo protocolos previamente descritos<sup>26</sup>. Brevemente, tras la muerte del animal por decapitación, se extrajo el cerebro y se seccionó la parte correspondiente a la corteza cerebral. El tejido obtenido, que se mantuvo a 4°C durante todo el proceso, se homogeneizó en sacarosa 0.32 M, utilizando un

homogeneizador de émbolo de teflón. El homogeneizador obtenido se centrifugó a 2.000 g y se recogió el sobrenadante, que se volvió a centrífugar a 30.000 g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en sacarosa 0.32 M. Este volumen se añadió sobre un gradiente de densidad previamente preparado y se centrífugó a 30.000 g. Tras centrífugar, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado que apareció en el centro del gradiente de densidad. El precipitado obtenido, correspondiente a la fracción sinaptosomal, se resuspende en medio de incubación en presencia o ausencia de calcio o (EGTA 2 mM), ajustando el volumen para obtener una concentración final de proteína de 0.5 mg/ml. Posteriormente, los sinaptosomas se incubaron en condiciones basales o despolarizantes con KCl 25 mM en un baño a 37°C durante 15 min. Después de este tiempo, se centrifugó a 30.000 g y se resuspendió en el medio de incubación correspondiente para los distintos ensayos. La fracción sinaptosomal obtenida se verificó mediante técnicas habituales de microscopía electrónica.

#### Determinación de la actividad mitocondrial

La determinación de la actividad mitocondrial en sinaptosomas se llevó a cabo utilizando la sal tetrazólica MTT<sup>26</sup>. Este compuesto es hidrolizado por la enzima mitocondrial succinato-dehidrogenasa, originando un compuesto azul oscuro que puede ser cuantificado espectrofotométricamente, y que es un índice del comportamiento bioenergético de la fracción sinaptosomal utilizada. Tras la incubación de los sinaptosomas, estos se resuspendieron en medio de incubación con MTT 1 mM, en presencia o ausencia de calcio. De cada muestra se tomó un volumen de 20 µl, por triplicado, y tras incubar durante 30 min a 37°C, se paró la reacción añadiendo 100 µl de isopropanol ácido. Se agitó la mezcla energicamente y por último se midió a un lado la longitud de onda de 550 nm con referencia a una longitud de onda de 620 nm.

#### Determinación de la formación de radicales libres

La determinación de la formación de radicales libres se llevó a cabo mediante una quimioluminiscencia. El cual se utilizan los potenciadores de quimioluminiscencia fueron 5-amino-2,3-dihidro-1,4-oftalazinediona marca (Luminol) o nitrato de bis-N-metilacridina marca (Lucigenina) a concentración 0.2 mM en medio de incubación en presencia o ausencia de calcio<sup>33</sup>. Los blancos de la prueba se realizaron con medio de incubación. Los resultados obtenidos se

expresaron en cuentas por minuto (CPM) y en porcentaje con respecto al control.

#### Determinación del grado de peroxidación lipídica

La determinación del grado de peroxidación lipídica se llevó a cabo analizando el contenido en TBARS<sup>33</sup>. Brevemente, a un volumen de sinaptosomas se le añadió el mismo volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Tras centrifugarse, se recogió el sobrenadante y se le añadió el mismo volumen de ácido tiobarbitúrico (4,6-dihidro-xipirimidina-2-tiolo) (TBA) al 0.67%. La mezcla se hirvió durante 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se midió y se leyó SUDO a 532 nm de longitud de onda. Como blanco se utilizó un volumen a partes iguales de TCA+TBA. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de densidad óptica y en porcentaje con respecto al control.

#### Determinación del grado de oxidación de proteínas

La determinación del grado de oxidación de proteínas se llevó a cabo analizando el contenido en grupos carbonilos y dieno-conjugados aparecidos en las muestras<sup>33</sup>. Brevemente, a un volumen de la suspensión de sinaptosomas se le añadió igual volumen de TCA al 20%. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 2,4-dinitrofenilhidrazina ácida 10 mM. A continuación se añadió TCA al 20%. Seguidamente se centrifugó y se desecharon el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en NaOH 1 M y se incubó a 37°C durante 15 min. Tras este tiempo, se centrifugó y se midió el sobrenadante a una longitud de onda de 360 nm. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de densidad óptica y en porcentaje con respecto al control.

#### Ánalisis estadístico

Para analizar el efecto producido por el alcohol sobre los niveles basales o estimulados con K<sup>+</sup> 25 mM en las diferentes variables estudiadas. Se utilizó el análisis múltiple de la varianza (MANOVA), seguido del test de rango múltiple de Newman-Keuls. Los valores de P<0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

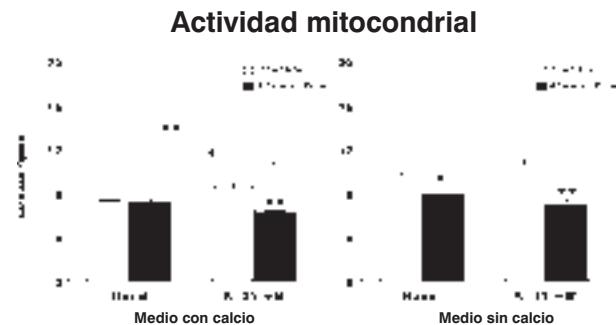
## RESULTADOS

#### Niveles de EtOH en suero

Los niveles de EtOH en plasma fueron de 120.26 ± 24.42 mg/dl.

*Efecto del EtOH sobre el comportamiento bioenergético mitocondrial.*

La actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón en el medio de incubación con calcio no mostró modificaciones significativas en condiciones basales en los grupos central y tratado con EtOH (figura 1A). Sin embargo, en ausencia de calcio se produjó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) en un 16.55% (figura 1B). Tras la estimulación con  $K^+$  25 mM se observó un incremento significativo ( $P<0.01$ ) de la actividad mitocondrial en presencia de calcio en un 16.28% (figura 1A). En ausencia de calcio no se produjeron modificaciones significativas. En condiciones despolarizantes la ingesta crónica de EtOH produjó una disminución significativa ( $P<0.01$ ) en un 25.81% en presencia de calcio en el medio, y de la misma forma en un 34.81% en ausencia de calcio (figura 1B). En situaciones de ingesta crónica de etanol, la despolarización actúa produciendo una disminución significativa ( $P<0.05$ ) del 11.10% en presencia de calcio (figura 1A). Por el contrario, en ausencia de calcio, no se aprecian modificaciones significativas (figura 1B).



**Figura 1.** Efecto de la ingesta crónica de EtOH sobre la actividad mitocondrial de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes, en presencia (A) o ausencia (B) de calcio. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica (Media ± SEM; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; n = 11).

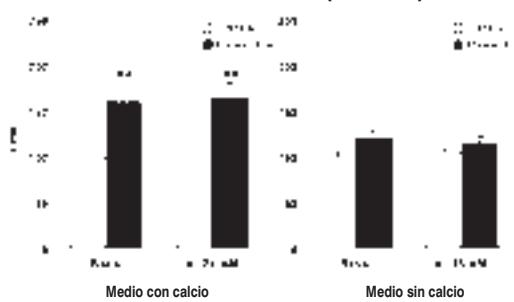
*Efecto del EtOH sobre los niveles de radicales libres*

*Efecto del EtOH sobre los niveles de peroxidación lipídica*

El análisis de la ingesta crónica de EtOH sobre los niveles de TBARS, como índice de peroxidación lipídica, de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón en presencia de calcio en el medio de incubación no muestra modificaciones significativas tanto en condiciones basales como en condiciones despolarizantes (figura 4A). Sin embargo, en ausencia de calcio en el medio de incubación la ingesta crónica de etanol produce un incremento significativo ( $P<0.01$ ) de los

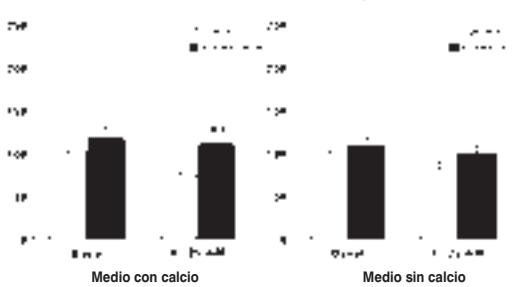
*Modificaciones calcio dependientes de radicales*

**Radicales libres (luminol)**



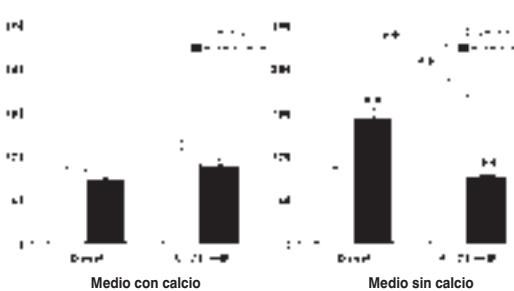
**Figura 2.** Efecto de la ingesta crónica de EtOH sobre la producción de radicales libres en sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes, en presencia (A) o ausencia (B) de calcio en el medio de incubación utilizando luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (CPM) y en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; \*\* $P<0.01$ ; n=11).

**Radicales libres (lucigenina)**



**Figura 3.** Efecto de la ingesta crónica de EtOH sobre la producción de radicales libres en sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes, en presencia (A) o ausencia (B) de calcio en el medio de incubación utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (CPM) y en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; \*\* $P<0.01$ ; n=11).

**Peroxidación lipídica (TBARS)**

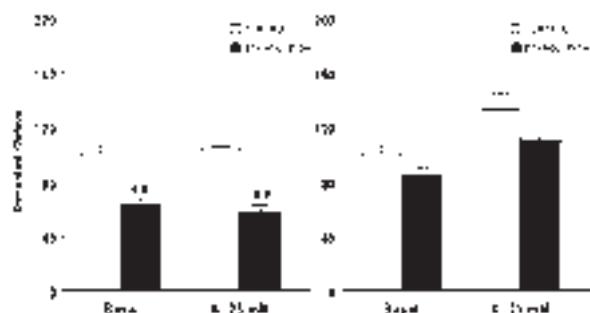


**Figura 4.** Efecto de la ingesta crónica de EtOH sobre los niveles de peroxidación lipídica TBARS en sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes, en presencia (A) o ausencia (B) de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica y en porcentaje con respecto al control (Media±SEM; \*\* $P<0.01$ ; n=11).

niveles de TBARS del 71.24%. De la misma forma, la estimulación con  $K^+$  25 mM también produce un incremento significativo ( $P<0.01$ ) del 102.07% sobre los niveles basales. En situación de ingesta crónica de etanol y tras la despolarización, en ausencia de calcio en el medio de incubación, se observa un descenso significativo ( $P<0.01$ ) del 46.95% de los niveles de TBARS. De la misma forma, en condiciones despolarizantes la ingesta crónica de etanol disminuye los niveles de peroxidación lipídica en un 53.04% ( $P<0.01$ ) (figura 3B).

#### Efecto del EtOH sobre los niveles de oxidación de proteínas

El análisis de la ingesta crónica de EtOH sobre los niveles de oxidación de proteínas de sinaptosomas de corteza cerebral de ratón en condiciones basales y en presencia de calcio en el medio de incubación muestra una disminución significativa ( $P<0.01$ ) del 36.21%. Sin embargo, tras la despolarización no se observan modificaciones significativas tanto en situaciones control como en situaciones de ingesta crónica de EtOH. En condiciones despolarizantes la ingesta crónica de EtOH produjo una disminución significativa ( $P<0.01$ ) de los niveles de oxidación de proteínas en un 43.74% (figura 5A). Por otro lado, en ausencia de calcio en el medio de incubación no se observan modificaciones significativas en ninguna de las situaciones experimentales (figura 5B).



**Figura 5.** Efecto de la ingesta crónica de EtOH sobre la proteína de sinaptosomas de corteza frontal de ratón, en condiciones basales y despolarizantes, en presencia (A) o ausencia (B) de calcio en el medio de incubación. Los resultados se expresan en unidades de densidad óptica y en porcentaje con respecto al control (Media  $\pm$  SEM; \*\* $P<0.01$ ; n=11).

## DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra como la ingesta *in vivo* de alcohol provoca algunos signos de toxicidad que quedan evidenciados por la alteración de diversos parámetros que son indicadores de los niveles de estrés oxidativo.

Aunque esté bien descrito que el consumo crónico de etanol durante largos períodos de tiempo puede dañar directamente el sistema nervioso<sup>34</sup> bien por él mismo, por medio de su metabolito oxidativo acetaldehido<sup>35,36</sup> o bien a través de sus metabolitos no oxidativos tales como los etilésteres de ácidos grasos<sup>37,38</sup> o el fosfatidiletanol<sup>39,40</sup>, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado escasos signos de toxicidad tras la administración de etanol *in vitro*<sup>32,41,42</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo aparecen signos algo más relevantes de toxicidad tras la ingesta de etanol *in vivo*.

Así, tras la ingesta de alcohol *in vivo*, y utilizando lucigenina como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, no se detectan variaciones en la formación de radicales libres (en especial el anión superóxido;  $O_2^-$ ) en condiciones basales e independientemente de la presencia o no de calcio en el medio. Pero si que aparece un incremento en la formación de radicales libres tras la ingesta *in vivo* de alcohol en condiciones despolarizantes y en presencia de calcio en el medio de incubación, pero no en ausencia de él. Cuando se utiliza luminol como potenciador de la señal de quimioluminiscencia, la ingesta de alcohol *in vivo* provoca un incremento en la producción de radicales libres (debidos preferentemente a los singulares de oxígeno;  $^1O_2$ ) tanto en condiciones basales como en condiciones despolarizantes, si bien esto sólo tiene lugar en presencia de calcio en el medio de incubación.

A diferencia de lo que sucedía en los experimentos realizados *in vitro*<sup>32,41,42</sup>, donde se observaba un incremento de la formación de radicales libres a causa del incremento de la actividad mitocondrial en condiciones basales, mientras que en condiciones despolarizantes el incremento de actividad mitocondrial no se correspondía con el incremento de los radicales libres debido a que los mecanismos antioxidantes que actúan normalmente fueran capaces de anular el leve efecto que parece ser inducido por el alcohol en esas condiciones experimentales, la ingesta de alcohol *in vivo* no modifica la actividad mitocondrial en condiciones basales en presencia de calcio, e incluso la disminuye en ausencia de calcio, mientras que en condiciones despolarizantes la ingesta de al-

cohol *in vivo*, tanto cuando el medio contiene calcio como cuando no, la actividad mitocondrial disminuye. Es probable, por tanto, que los radicales libres detectados tras la ingesta de alcohol *in vivo* sean consecuencia directa de la acción del alcohol e independientes de la actividad mitocondrial. De hecho, otros autores también han descrito que la ingesta crónica de alcohol potencia la formación de radicales libres a nivel cerebral<sup>43</sup>.

Por otro lado, tras la ingesta de alcohol *in vivo* tampoco se detecta peroxidación lipídica en los sinaptosomas ni en condiciones basales ni en condiciones despolarizantes cuando el medio contiene calcio. Sin embargo, el contenido en grupos carbonilo de las proteínas, y en contra de lo que cabría esperar, disminuye de forma acusada. Es muy probable que esta disminución en el contenido de grupos carbonilo de las proteínas tras la ingesta *in vivo* de alcohol sea consecuencia de posteriores modificaciones en estas moléculas no relacionadas con fenómenos neurotóxicos. De hecho, se han descrito alteraciones estructurales de las proteínas que alteran su contenido en grupos carbonilo por procesos de glicosilación tanto enzimática como no enzimática<sup>44</sup>. El papel del alcohol en estos procesos necesita de una investigación más profunda. Sin embargo, es muy interesante destacar como tras la ingesta de alcohol *in vivo* si se detectan niveles elevados de peroxidación lipídica en condiciones basales cuando el medio no contiene calcio, fenómeno también descrito por Montoliu, et al<sup>43</sup>, y esto puede ser debido a otros radicales libres distintos de las especies reactivas al oxígeno o del ión hidroxilo (OH<sup>-</sup>), que no parecen ser detectados por los potenciadores de la señal quimioluminiscente luminol y lucigenina<sup>45</sup>, utilizados en el presente estudio. No obstante, este incremento en los niveles de peroxidación lipídica tampoco modifica el contenido en grupos carbonilo de las proteínas. Y por el contrario, en condiciones despolarizantes y en ausencia de calcio en el medio, los niveles de peroxidación lipídica encontrados tras la ingesta de alcohol *in vivo* son muy bajos. Normalmente, las células están equipadas con mecanismos de defensa antioxidativos de muy diverso tipo, que van desde moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, los tocoferoles o la vitamina E, hasta sistemas enzimáticos más complejos como el de la SOD o el de la catalasa. El mantenimiento de un adecuado equilibrio entre elementos prooxidantes y antioxidantes se puede ver alterado de muy diversas formas como consecuencia de la acción del alcohol<sup>46</sup>.

Nuestros resultados, en cualquier caso, apuntan

hacia un papel destacado de los niveles de calcio en estos indicios de toxicidad imputables al alcohol. En este sentido, también se ha descrito que el etanol es un inhibidor potente de la función del receptor NMDA en una variedad de preparaciones neuronales de cerebro y neuronas en cultivo<sup>47</sup>. El etanol inhibe las corrientes catiónicas vía receptor NMDA<sup>49</sup> y de una forma menos extendida vía receptor AMPA<sup>50</sup>, produciendo depresión del incremento del calcio intracelular<sup>40</sup>, lo cual puede ser responsable de los pequeños signos de toxicidad encontrados tras el tratamiento con etanol.

## Agradecimientos

Financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS) PIO 030922.

## REFERENCIAS

1. Stone TW. *Neuropharmacology*. Oxford, University Press, 1995.
2. Tabakoff B, Hoffman PL. Biochemical pharmacology of alcohol. En Meltzer HY, editor. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven Press 1987.
3. Gonzalez RA, Hoffman PL. Receptor gated channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends in Pharmac Sci* 1991; 12:1-3.
4. Castoldi AF, Barni S, Randine G, Costa LG, Manzo L. Ethanol selectively interferes with the trophic action of NMDA and carbachol on cultured cerebellar granule neuron undergoing apoptosis. *Dev Brain Res* 1998; 111: 229-89.
5. Erickson CK. Review of neurotransmitters and their role in alcoholism treatment. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 5-11.
6. Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 385-431.
7. French SW. The mechanism of organ injury in alcoholics: implications for therapy. *Alcohol Alcohol Suppl* 1991; 1: 57-63.
8. Schaad NC, Magistretti PJ, Schorderet M. Effects of ethanol on VIP and/or noradrenaline-stimulated cAMP formation in mouse brain. *Alcohol* 1988; 5: 445-9.
9. Guerri C, Grisolia S. Chronic ethanol treatment affects sinaptosomal membrane-bound enzymes. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 18: 45-50.
10. Logan BJ, Laverty R, Peake BM. Measurements on the effects of ethanol on the lipid and protein conformation in biological membranes. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 18: 31-5.
11. Rubin E, Rottenberg H. Ethanol-induced injury and adaptation in biological membranes. *Fed Proc* 1982, 41: 2465-71.
12. Dachour A, De White P. Ethanol and amino acids in the central nervous system: assessment of the pharmacological actions of acamprosate. *Prog Neurobiol* 2000; 60: 343-62.
13. Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parson LH, Heyser CJ, Hyttia P, et al. Neurochemistry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 3-9.
14. Wozniak KM, Linnola M. Recent advances in pharmacological research on alcohol. Possible relations with cocaine. *Recent Dev Alcohol* 1992; 10: 235-72.
15. Kianmaa K. Neuronal mechanism of ethanol sensitivity. *Alcohol*

- Alcohol* 1990; 25: 257-62.
16. Kuriyama K, Ohkuma S. Alteration in the function of cerebral neurotransmitters receptors during the establishment of alcohol dependence: neurochemical aspects. *Alcohol Alcohol* 1990; 25: 239-49.
17. Sheng ZH, Westenbroek RE, Catterall WA. Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels and the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 335-45.
18. Langley K, Grant NJ. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? *Neurochem Int* 1997; 31: 739-77.
19. Erecinska M, Zaleska MM, Chiu L, Nelson D. Transport of asparagine by rat brain synaptosomes: an approach to evaluate glutamine accumulation. *J Neurochem* 1991; 57: 491-8.
20. Szutowicz A, Tomaszewicz M, Bielarczyk H. Key role of acetyl-CoA in cytoplasm of nerve terminals in disturbances of acetylcholine metabolism in brain. *Folia Neuropathol* 1997; 35: 241-3.
21. Avrova NF, Shestak KI, Zakharova IO, Sokolova TV, Leonfev VG. The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem Res* 1999; 24: 1101-6.
22. Huang HM, Toral-Barza L, Gibson G. Cytosolic free calcium and ATP in synaptosomes after ischemia. *Life Sci* 1991; 48: 1439-45.
23. Hertz L, Peng L. Effects of monoamine transmitters on neurons and astrocytes: correlation between energy metabolism and intracellular messengers. *Prog Brain Res* 1992; 94: 283-301.
24. Curti D, Izzo E, Brambilla L, Facchetti G, Sangiovanni G, Branbilla G. Effect of a ubiquinone-like molecule on oxidative energy metabolism in rat cortical synaptosomes at different ages. *Neurochem Res* 1995; 20: 1001-6.
25. Erecinska M, Nelson D, Deas J, Silver IA. Limitation of glycolysis by hexokinase in rat brain synaptosomes during intense ion pumping. *Brain Res* 1996; 716: 153-9.
26. Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, Mayas-Torres, García-López MJ, Ramírez-Sánchez M. Utility of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay to measure mitochondrial activity in K<sup>+</sup>- and ATP-stimulated rodent cortex synaptosomes. *Neurosci Res Commun* 2000; 27: 103-7.
27. Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, et al. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem* 1997; 69: 273-84.
28. Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K, Shaw W, Carney JM. Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 191-201.
29. Callahan B, Yuan J, Stover G, Hatzidimitriou G, Ricaurte G. Effects of 2-deoxy-D-glucose on methamphetamine-induced dopamine and serotonin neurotoxicity. *J Neurochem* 1998; 70: 190-7.
30. Struzynska L, Dabrowska-Bouta B, Rafalowska U. Acute lead toxicity and energy metabolism in rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiol Exp* 1997; 57: 275-81.
31. Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP. Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An *in vitro* study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* 1996; 27: 941-50.
32. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Ethanol modifies differently aspartyl- and glutamyl-aminopeptidase activities in mouse frontal cortex synaptosomes. *Brain Res Bull* 2002; 57: 195-203.
33. Küçükkaya B, Haklar C, Yalçın AS. NMDA excitotoxicity and free radical generation in rat brain homogenates: Application of chemiluminescence assay. *Neurochem Res* 1996; 21: 1533-6.
34. King MA, Hunter BE, Walker DW. Alterations and recovery of dendritic spine density in rat hippocampus following long-term ethanol ingestion. *Brain Res Bull* 1988; 45: 381-5.
35. Bondy SC, Guo SX. Regional selectivity in ethanol-induced pro-oxidant events within the brain. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 69-72.
36. Hunt WA. Role of acetaldehyde in the actions of ethanol on the brain. A review. *Alcohol* 1996; 13: 147-51.
37. Bora PS, Lange LG. Molecular mechanism of ethanol metabolism by human brain to fatty acid ethyl esters. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 28-30.
38. De Jersey J, Treolar T. Byosynthesis and possible pathological significance of fatty acid ethyl esters. *Alcohol Alcohol* 1994; 2: 171-6.
39. Gustavsson L. Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D. *Alcohol Alcohol* 1994; 30: 391-406.
40. Dodd PR, Beckmann AM, Davidson MS, Wilce PA. Glutamate-mediated transmission, alcohol and alcoholism. *Neurochem Int* 2000; 37: 509-33.
41. Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Influencia del alcohol sobre las aminopeptidetasas cerebrales. Estudio *in vitro*. *Rev Neurol* 2001; 32: 1031-40.
42. Mayas MD, Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M. Influencia del alcohol etílico sobre la actividad aminopeptidasa A de sinaptosomas corticales de ratón. *Arch Neurocienc* 2000; 5: 120-6.
43. Montoliu C, Valles S, Renau-Piquer J, Guerri C. Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem* 1994; 63: 1855-62.
44. Levine RL, Garland D, Oliver CV, Amici A, Climent J, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186: 464-78.
45. Muller-Peddinghans R. *In vitro* determination of phagocyte activity by luminol- and lucigenin-amplified chemiluminescence. *Int J Immunopharmacol* 1984; 6: 455-66.
46. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 1993; 16: 439-44.
47. Woodward JJ. Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem Int* 1999; 35: 93-4.
48. Smothers CT, Clayton R, Blevins T, Woodward JJ. Ethanol sensitivity of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurochem Int* 2001; 38: 333-40.
49. Wirkner K, Poelchen W, Köles L, Mühlberg K, Scheibler P, Allgaier C, et al. Ethanol induced inhibition on NMDA receptor channels. *Neurochem Int* 1999; 35: 153-62.
50. Netzeband JG, Trotter C, Parsons KL, Gruol DL. Chronic ethanol treatment alters AMPA induced calcium signals in developing Purkinje neurons. *Brain Res* 1999; 826: 270-8.