

## ¿ES POSIBLE REVERTIR LA NARCOSIS POR ALCOHOL INYECTANDO UN NEUROTRANSMISOR?

Cessia Arias Coronado, Daniella Domínguez Vigdor, Sayra López Yever y Lorena Toledo  
Trueba  
Colegio Marymount  
Estrella del Norte #6 Col. Rancho Tetela CP. 62160, (777)3124277  
[colegio@marymount.edu.mx](mailto:colegio@marymount.edu.mx)

**Palabras clave:** *Narcosis, neurotransmisor, alcohol*

### Resumen

Nuestro proyecto consistió en tratar de determinar sí y a qué dosis el TRH (inyectado intraperitonealmente) era capaz de revertir la narcosis inducida por el etanol inyectado previamente de la misma manera en ratas adultas jóvenes de la cepa Wistar. Trabajamos con 12 ratas y las dividimos en cuatro grupos diferentes. A cada grupo se le asignó previamente una dosis diferente de TRH, clasificando a los grupos por grupo control, dosis baja, media y alta. Se inyectó a las ratas con una dosis de etanol establecida y más adelante con cada dosis de TRH correspondiente, observándolas y anotando los tiempos del despertar. Posteriormente se hizo un análisis estadístico para determinar si hubo efecto del TRH sobre las ratas, si se revirtió la narcosis y si los resultados entre grupos eran significativamente diferentes. Al finalizar el proyecto y con los resultados obtenidos se pudo determinar que con la dosis de 30 mg/kg se revierte la narcosis por etanol en la rata. Los resultados pueden ser utilizados más adelante para la creación de un fármaco de uso humano que revierta la narcosis inducida por alcohol.

### Marco Teórico

Las funciones del sistema nervioso se sustentan en la actividad de neuronas que se comunican entre sí a través de neurotransmisores. Las neuronas son las células del sistema nervioso encargadas de enviar rápidamente información de una parte de nuestro cerebro a otra; son las células responsables de generar nuestras emociones, movimientos, entre otros. Los neurotransmisores son sintetizados y liberados por las neuronas y afectan a otras neuronas porque interaccionan con receptores localizados en la superficie celular. La actividad del sistema nervioso se sustenta en parte sobre el balance de neurotransmisores estimuladores (glutamato) y neurotransmisores inhibitorios (GABA - ácido gama amino butírico). La actividad de estos neurotransmisores es modulada por una amplia gama de neuromoduladores (1). El etanol tiene múltiples efectos sobre el sistema nervioso, entre ellos, estimulante a

bajas dosis y narcótico a dosis mayores. Algunos de estos efectos se deben a una interacción del alcohol con los sistemas de neurotransmisores; en particular afecta la comunicación por el glutamato y el GABA (2). Otro neurotransmisor es la hormona liberada tirotropina (TRH), un péptido que tiene efectos sobre el sistema endocrino así como efectos homeostáticos en el sistema nervioso central. Uno de los múltiples efectos de la inyección del TRH es el de inducir el despertar después de una intoxicación con etanol. Este efecto se puede observar después de una inyección intraperitoneal o intracerebral del TRH (3).

### **Antecedentes**

Algunos estudios clínicos han examinado los posibles efectos terapéuticos del TRH. El neurotransmisor generó una respuesta antidepresiva al administrarse a pacientes con depresión, sin embargo los resultados no son consistentes y por ello todavía se duda sobre el efecto real del péptido en el tratamiento contra la depresión. Otros estudios también se han llevado a cabo para ver si el TRH puede ser utilizado en el control de convulsiones en los humanos, pero los resultados son de igual manera inconclusos debido al difícil control del péptido por su corta vida de plasma. Sin embargo, sí se ha obtenido información benéfica sobre el control de espasmos infantiles, el síndrome de Lennox-Gastón en niños y convulsiones parciales (4).

En el laboratorio de Neurobiología del Instituto de Biotecnología de la UNAM, los investigadores se cuestionaron si incrementar la cantidad endógena del TRH en el medio extracelular del cerebro es suficiente para inducir el despertar de la narcosis. Esto es, se desea saber si el TRH es naturalmente capaz de inducir el despertar. Para manipular los niveles endógenos del TRH, se pretende aprovecharse de la existencia de inhibidores de la enzima que inactiva al TRH en el medio extracelular (5). Se supone que al inhibirse esta enzima se incrementarán los niveles del TRH endógeno en el medio extracelular del cerebro y que se obtendrá un efecto similar al de inyectar TRH exógeno.

### **Hipótesis**

El inyectar intraperitonealmente TRH revierte los efectos de la narcosis producida por la inyección de etanol en ratas adultas jóvenes.

### **Objetivo**

Determinar sí y a qué dosis el TRH (inyectado intraperitonealmente) es capaz de revertir la narcosis inducida por el etanol inyectado previamente de la misma manera en ratas adultas jóvenes de la cepa Wistar mantenidas en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **Metodología**

Localidad: Se asistió al Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Materiales y Equipo: 12 ratas, etanol puro, péptido TRH disuelto en solución salina, jeringas, jaulas, videograbadora. (Ver Fig. 1 para observar los pasos claves para la realización del experimento (desarrollo experimental) que se explican a continuación).

1. Se dividió a los animales en cuatro grupos de tres ratas (jóvenes) cada uno.
2. El primer grupo fue el grupo control. A éstos animales se les inyectó (intraperitonealmente) con una dosis de etanol (2 g/kg de peso) y 20 min. después se les inyectó una solución salina.
3. Al segundo grupo se les inyectó (intraperitonealmente) una dosis de etanol (2 g/kg de peso) y 20 min. después se les inyectó con una dosis baja de TRH (3 mg/kg de peso) disuelta en solución salina.
4. Al tercer grupo se les inyectó (intraperitonealmente) una dosis de etanol (2 g/kg de peso) y 20 min. después se les inyectó con una dosis mediana de TRH (10 mg/kg de peso) disuelta en solución salina.
5. Al cuarto grupo se les inyectó (intraperitonealmente) una dosis de etanol (2 g/kg de peso) y 20 min. después se les inyectó con una dosis alta de TRH (30 mg/kg de peso) disuelta en solución salina.

Para evitar que la diferencia de tiempo afectara a las ratas de los diferentes grupos, las pruebas se hicieron de la siguiente manera:

Primero a una rata del grupo 1, después a otro del grupo 2, seguido por una del grupo 3, y al final uno del grupo 4.

(Este procedimiento se repitió dos veces más, hasta que todas las ratas fueron inyectadas con etanol y TRH disuelto en solución salina.)

En todos los casos, se midió el tiempo entre la inyección del etanol y el momento del despertar, es decir, que lograron sostenerse sobre sus cuatro patas durante 30 segundos.

Se grabó con una videograbadora el comportamiento de las ratas antes y después de las inyecciones para un mejor control de los tiempos en caso de alguna duda. Los resultados se anotaron en una bitácora.

#### Análisis y comparación de resultados:

1. Se comparó el resultado de los diferentes grupos de ratas, ya que se registraron todos los resultados en la bitácora.
2. Se realizó un análisis estadístico para determinar si hubo un efecto del TRH sobre las ratas y a que dosis. Para esto se calculó la desviación estándar y se observó si hubo un cambio significativo.
3. Se realizaron los cálculos de la prueba t para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos. El propósito de la prueba fue analizar si el promedio de la muestra de una sola población era diferente a un valor esperado E. (6). El valor esperado E se determinó de acuerdo a la incertidumbre que se deseó permitir, el cual fue 5 % en este caso.

Variables:

*Independientes:*

Dosis de etanol (2 g/kg de peso)

Dosis de TRH (3 mg/kg, ó 10 mg/kg ó 30 mg/kg de peso)

*Dependientes:*

Tiempo que tardan las ratas en despertar

Comportamiento de las ratas al despertar

## Desarrollo Experimental

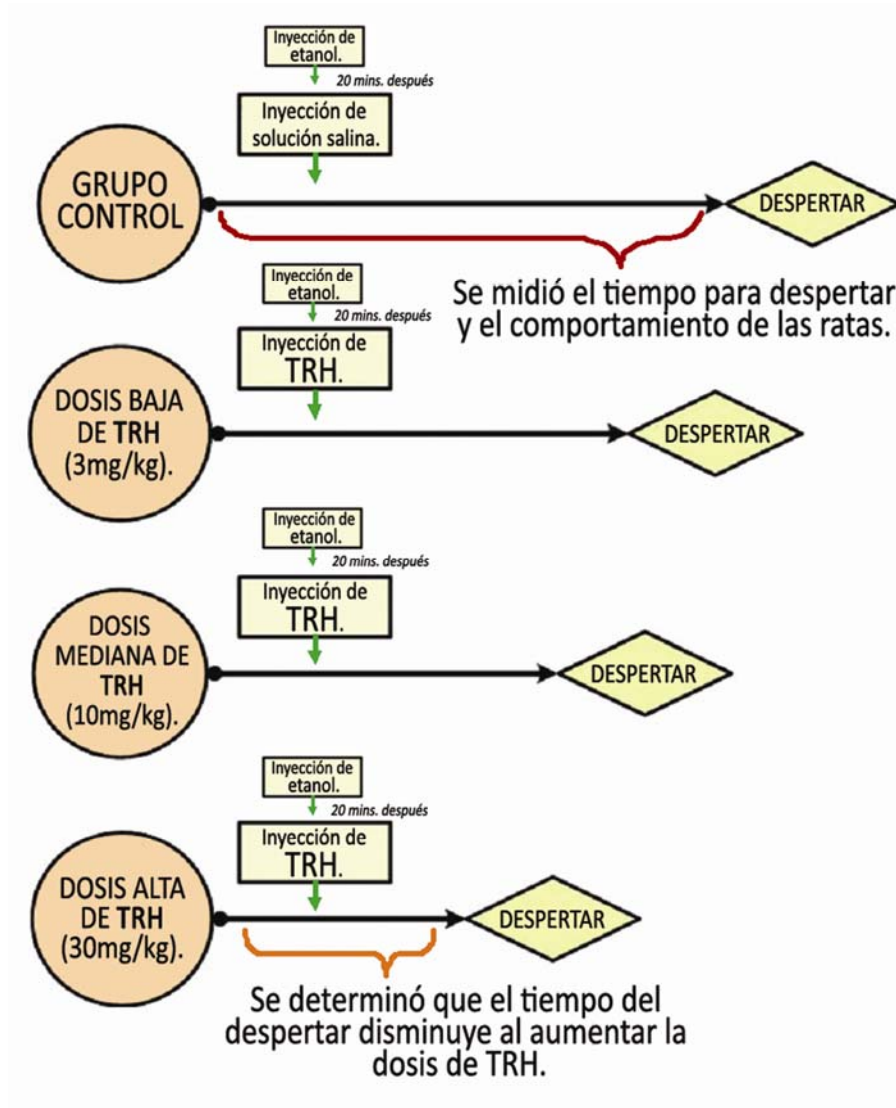


Figura 1 – Pasos seguidos a lo largo del experimento.

## Procedimiento de la inyección y el despertar



1. Se coloca a la rata en la jaula.



2. La rata se acostumbra a la jaula.



3. Se inyectó el etanol y posteriormente la dosis de TRH.



4. La rata se queda dormida y llega a la narcosis.



5. Después de un tiempo (dependiendo de cada dosis de TRH) la rata se despierta; contándolo desde que se puede sostener en sus cuatro patas por 30 segundos

## Resultados y Análisis de datos

Al finalizar el experimento siguiendo cada paso indicado en la metodología (Fig. 1) se revisó el video detalladamente para obtener los tiempos exactos de la duración de la narcosis y observar el comportamiento de las ratas. Los datos para cada rata se vaciaron en una tabla y con ellos se calcularon la media del tiempo del despertar, la desviación estándar y la prueba t. A primera instancia se pudo observar (en la columna de duración de la anestesia en minutos en la Tabla 1) que hubo una reducción notoria en la duración de la narcosis comparando el grupo control (que sólo fue inyectado con solución salina) y el grupo n.4 (inyectado con la mayor dosis de TRH).

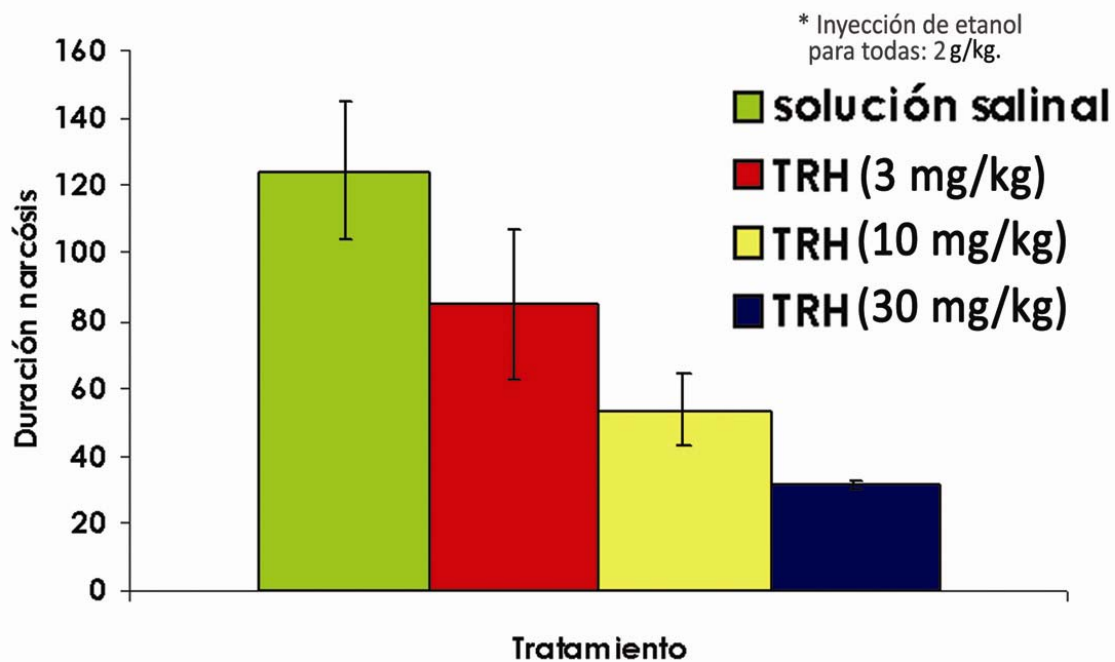
Los cálculos (ver Anexo 1) comenzaron con obtener la media del tiempo de despertar para cada grupo de ratas (esto es, la suma de los tiempos del despertar dividida entre el número de ratas por grupo). Con estos datos se prosiguió a obtener la desviación estándar por grupo utilizando la siguiente fórmula:

$$\sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(Los datos de la media de cada grupo con su desviación estándar se observan en la Figura 2 y en la Tabla 2).

# rata	Peso (g)	25 minutos después Inyección	Duración de la anestesia (minutos)
1	271	Solución salina al 0.9%	109
2	266		106
3	314		158
4	295	TRH en solución salina (3 mg/kg)	97
5	295		108
6	265		49
7	304	TRH en solución salina (10 mg/kg)	46
8	245		71
9	285		43
10	245	TRH en solución salina (30 mg/kg)	33
11	252		30
12	297		31

Tabla 1 - Compilación de resultados para cada variable tomada en cuenta durante el experimento.



**Figura 2** - En la siguiente gráfica se muestra la media de cada grupo y su desviación estándar

Dosis de TRH inyectada (mg/kg)	s	Significancia estadística
0	124.3 (+-) 29.2	a
3	84.7 (+-) 31.4	a / b
10	53.3 (+-) 15.4	b
30	31.3 (+-) 1.52	c

**Tabla 2** - Compilación de resultados del análisis estadístico para cada grupo de ratas.

Las letras, en este caso, muestran la relación entre los grupos. Aquellas que se repiten indican que esos dos grupos no muestran una diferencia significativa entre sus medias del tiempo del despertar.

Por último, se llevó a cabo la prueba t (que sirve para comprobar si la media individual de una población es diferente a un valor esperado (6)), para comparar los diferentes grupos y determinar si los resultados eran significativamente diferentes. Para cada comparación entre grupos, se obtuvo primero el error estándar entre ellos. Para determinar si las medias de los grupos comparados son significativamente diferentes, el resultado de la t debe ser mayor que la "t" estándar. Este valor esperado se determina al escoger el nivel de confianza deseado. Nosotros escogimos tener un 95% de confianza en los resultados, por lo tanto permitiríamos un margen de error del 5%.

Este valor conocido como la “t” estándar es de 2.776 de acuerdo al nivel de confianza escogido.

Primero, obtuvimos que en la comparación de grupos todos son significativamente diferentes en relación al grupo control (grupo 1) excepto el grupo 2 (3 mg/kg de TRH) (En la Fig. 2 se puede observar que las desviaciones se sobreponen). Por lo tanto, para los otros grupos en los cuales el valor de la t fue mayor que la “t” estándar, se rechazó la hipótesis nula (la cual indicaba que no eran resultados significativamente diferentes).

De igual manera, la t de la comparación de los grupos 1 & 3 (10 mg/kg de TRH) es menor que la t de los grupos 1 & 4 (30 mg/kg de TRH), lo que indica que existe una mayor diferencia significativa al aumentar la dosis de TRH en este caso. Con estos resultados vemos que al aumentar la dosis de 3 mg/kg a 30 mg/kg sí hay un cambio significativo, por lo que aumentando la dosis de TRH sí se reduce el tiempo de la narcosis.

Sin embargo, debido a que las comparaciones de los grupos 1 & 2, 2 & 3 y 3 & 4 no son significativamente diferentes, no pudimos determinar exactamente a qué dosis el TRH ya sirve para revertir la narcosis; cosa que nos habíamos propuesto hacer al principio del proyecto. Lo que sí se determinó en relación a nuestros objetivos fue que al utilizar la dosis de 30 mg/kg sí hay una diferencia significativa de ese grupo con el grupo control y el de la dosis menor de TRH, entonces al utilizar el TRH en una dosis de 30 mg/kg si hay una posibilidad alta de su efectividad (95 % como nosotros lo decidimos analizar de acuerdo a la incertidumbre de la prueba t). De igual manera, se ve que tanto el grupo control comparado con los grupos tres y cuatro si muestra una diferencia significativa (Tabla 2) y por ello se puede observar de nuevo que aumentando la dosis de TRH el tiempo del despertar es menor. Los datos demuestran una tendencia general del menor tiempo del despertar al ir aumentando la dosis, lo que habíamos pensado que ocurriría debido a los efectos y características del péptido.

Al analizar todos nuestros resultados vemos que el neurotransmisor sí tiene efectos homeostáticos en el sistema nervioso ya que regresa a las ratas a su estado normal y estabiliza los efectos causados por el etanol previamente inyectado. El hecho de que la narcosis se revierta está relacionado directamente con la interacción del péptido y los receptores de la superficie celular de las neuronas, haciendo que los efectos del alcohol debido a la interacción con los neurotransmisores y células cerebrales dejen de alterar el sistema nervioso y se restablezca a la actividad cerebral normal.

De igual manera, el sistema nervioso controla nuestras emociones, así como la percepción y el sistema motor (1). Al tener dosis altas de alcohol en el cuerpo, el sistema nervioso se ve afectado y con él las partes que controla, siendo el TRH, de acuerdo a lo observado, el neurotransmisor que ayuda a revertir estos efectos y hacer que se vuelva a tener control del sistema motor y de nuestra percepción. Las ratas, ya cuentan con una cantidad pequeña de TRH endógeno en el medio extracelular del

cerebro (5). Esta cantidad de TRH no es suficiente para revertir el efecto narcótico, sin embargo se observó al terminar el proyecto que aumentando esta cantidad endógena de el TRH, sí se induce naturalmente el despertar.

Debido a los resultados positivos que indican que el efecto homeostático del TRH, se pretende en un futuro encontrar una manera de inhibir la enzima que controla los niveles endógenos del TRH para incrementar los mismos y lograr el mismo efecto que se observó en el proyecto al inyectar TRH exógeno intraperitonealmente en las ratas.

## **Conclusiones**

Al llevar a cabo el análisis de los datos y resultados, se puede observar que al incrementar la dosis de TRH el tiempo de la narcosis disminuye y las ratas se despiertan más rápidamente. El grupo 4, en relación a los demás, no demuestra sobreponerse con ningún otro y por ello concluimos finalmente que la dosis de 30 mg/kg siendo inyectada intraperitonealmente sí revierte la narcosis inducida por el etanol en la rata (con un 5 % de incertidumbre de acuerdo a lo calculado). De igual manera, la tendencia de la disminución del tiempo de la narcosis al aumentar la dosis deja claro los efectos del TRH en relación a la narcosis. Todos los resultados del proyecto, indican que el TRH como neurotransmisor si tiene efectos homeostáticos en el sistema nervioso y es efectivo como revertidor de la narcosis inducida por alcohol.

Los resultados del proyecto pueden ser utilizados más adelante para la creación de un fármaco de uso humano para la reversión de la narcosis inducida por alcohol. Al nosotros comprobar el efecto del neurotransmisor con este proyecto, el Dr. Charli y sus colegas planean continuar su investigación relacionada más que nada con la fijación del TRH endógeno en el cerebro. Se busca, llegar a hacer más largo el tiempo del efecto del TRH (su fijación en el cerebro) así como poder entender cómo se puede incrementar de alguna manera su producción. En las ratas, observamos que al inyectar de forma exógena el péptido, se incrementan los niveles del mismo y se logra el efecto deseado. Más adelante se espera llegar a controlar la enzima que lo produce así como su inhibición. De esta manera, lograr incrementar los niveles de TRH de una forma más natural sin la necesidad de una inyección de TRH exógeno (tal como lo realizamos nosotros).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. J.L Charli y P. Joseph-Bravo. (2008) El cerebro, la comunicación intercelular y los peptidos. En: Una ventana al quehacer científico; Instituto de Biotecnología de la UNAM; 25 aniversario. A. Lopez-Munguia y F. Rebolledo compiladores; Instituto de Biotecnología y Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM ISBN 978-970-32-4658-8 (en prensa).
2. Criswell HE, Breese GR. (2005) A conceptualization of integrated actions of ethanol contributing to its GABA mimetic profile: a commentary. *Neuropsychopharmacology* 30(8):1407-25.

3. Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough GG, Prange AJ Jr, Winokur A. (2003) The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(2):410-416.
4. Cott JM, Breese GR, Cooper BR, Barlow S, Prange AJ Jr. (1976) Investigations into the mechanism of reduction of ethanol sleep by thyrotropin-releasing hormone (TRH). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 196(3):594-604.
5. I. Pascual, Sh. Gil-Parrado, M. Cisneros, P. Joseph-Bravo, J. Diaz, L. Possani, J.L. Charli and M. Chavez. (2004). Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*. *In vivo* effects in rodent brain. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 138-152
6. Ennos, R. (2006) *Statistical and Data Handling Skills in Biology*, Pearson Education Limited, England; ISBN 13: 9780131955844

## Anexo de cálculos

1. Esta tabla muestra todos los datos obtenidos al calcular las medias, desviaciones estándar y errores estándar para cada grupo de ratas. Las operaciones se encuentran en la bitácora.

Grupo	Duración de narcosis (min.)	Media	S	SE
1	109	124.33	29.19	16.85
	106			
	158			
2	97	84.66	31.37	18.11
	108			
	49			
3	46	53.33	15.37	8.87
	71			
	43			
4	33	31.33	1.52	0.88
	30			
	31			