

## Dosis medias y altas de cafeína no revierten la incoordinación motora producida por alcohol en ratones

NOEMÍ SAN MIGUEL  
al117598@uji.es

LAURA LÓPEZ CRUZ  
lcruz@uji.es

MARTA PARDO  
mpardo@uji.es

MERCÈ CORREA  
correa@uji.es

### Resumen

En los últimos años, el consumo de las bebidas energéticas ha incrementado notablemente, así como su concentración de cafeína. Con frecuencia, estas bebidas se consumen junto a grandes cantidades de alcohol con el objetivo de reducir la sedación y la incoordinación producida por esta sustancia. Uno de los mecanismos de acción del alcohol sobre el sistema nervioso central (SNC) es el incremento del tono adenosinérgico, el cual puede estar mediando los efectos sedativos e incoordinantes observados tras su consumo. Por otra parte, la cafeína es una metilxantina que actúa como un antagonista no selectivo de los receptores de adenosina  $A_1$  y  $A_{2A}$ . Con el objetivo de estudiar la interacción entre la cafeína y el alcohol en la incoordinación motora, en el presente estudio con ratones, se administró cafeína de manera aguda y se evaluó su impacto sobre los efectos incoordinantes producidos por el alcohol recibido también de manera aguda, o en animales que han estado pre-expuestos repetidamente a alcohol. Las dosis de ethanol utilizadas en estos experimentos produjeron incoordinación motora, mientras que las dosis de cafeína utilizadas mostraron una tendencia no significativa a mejorar dicha ejecución. La cafeína no revirtió la incoordinación motora inducida por alcohol, independientemente del patrón de administración agudo o repetido. Así pues, dosis medias y altas de cafeína no demuestran un efecto terapéutico sobre el deterioro motor producido por el alcohol.

**Palabras clave:** etanol, cafeína, incoordinación motora, ratones, bebidas energéticas.

### Abstract

Energy drinks are highly consumed beverages rich in caffeine. In humans, energy drinks are very frequently consumed with alcohol in order to reduce the sedation and incoordination induced by high doses of this drug of abuse. Both drugs have shown to exert

effects on the adenosine system. Ethanol is a central nervous system (CNS) depressant that increases the adenosinergic tone, and this effect is thought to mediate the sedative and incoordinating effects observed after alcohol consumption. On the other hand, caffeine is a methylxanthine that acts as a non-selective adenosine antagonist, binding to the two main types of adenosine receptors present in the CNS: the A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> subtypes. The aim of the present study was to fold: to explore the effect of an acute caffeine administration (15 or 30 mg/kg, administered intraperitoneally, IP) on the incoordination effects of ethanol, and to study the acute effect of this methylxanthine in animals that had been repeatedly pre-exposed to ethanol before being tested. The acute administration of ethanol (1.5 g/kg, IP) produced motor impairment in the rotarod when is compared to the control vehicle group. However, caffeine was unable to reverse the impairing effects of an acute dose of ethanol, and did not improved the ataxia produced by a repeated administration of ethanol (1.5 g/kg). Thus, these results show that the non-selective adenosine antagonist caffeine at moderate to high doses (15 and 30 mg/kg) is not efficacious at counteracting the incoordination produced by alcohol in mice, neither after acute, nor after repeated pre-exposure to alcohol.

**Keywords:** ethanol, caffeine, motor incoordination, mice, energy drinks.

## Introducción

La cafeína y el alcohol son dos sustancias psicoactivas ampliamente consumidas (Fredholm *et al.*, 1999). El interés por el estudio de la cafeína se ha incrementado tras la relativamente reciente aparición de las bebidas energéticas. Estas bebidas contienen altas concentraciones de cafeína y, entre la población más joven, se consumen combinadas con bebidas alcohólicas (Reissig *et al.*, 2008) dado que existe una creencia popular de que la cafeína es capaz de antagonizar los efectos intoxicantes del etanol (Hasenfratz *et al.*, 1993). Sin embargo, no todos los estudios realizados dan soporte a esta creencia.

La importancia del estudio de la interacción de estas dos sustancias se debe a que su consumo combinado parece incrementar el consumo de alcohol, se consume con más frecuencia y en mayor cantidad (Ferrè y O'Brien, 2011). Debido a que el consumo de estas dos sustancias es cada vez mayor, es necesario conocer cómo interaccionan a nivel neurobiológico.

En este sentido, es lógico empezar por el estudio del sistema adenosinérgico. La adenosina es un neuromodulador del sistema nervioso central (SNC) que extracelularmente actúa sobre cuatro subtipos de receptores: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Olah y Stiles, 2000), aunque los dos primeros son los que se expresan en mayor medida en el SNC. Concretamente la modulación de la incoordinación motora inducida por alcohol tras una administración aguda se ha sugerido que puede estar mediada principalmente por el receptor A<sub>1</sub> (Dar, 2001).

Por otra parte, la cafeína es un antagonista no selectivo de adenosina que produce efectos psicoestimulantes. Específicamente, la cafeína actúa con mayor preferencia por los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>. No obstante, las metilxantinas tales como la cafeína y la teofilina, ejercen efectos estimulantes en la locomoción a dosis bajas-moderadas, pero a dosis altas pueden llegar a producir efectos supresores (López-Cruz *et al.*, 2011; Pardo *et al.*, 2013), por tanto, dependiendo de la dosis produce efectos bifásicos en la actividad locomotora.

Uno de los efectos intoxicantes del etanol a dosis medias y altas es la incoordinación motora en roedores (Chuck *et al.*, 2008; Dar *et al.*, 1983). La cafeína por su parte ha demostrado no tener efectos incoordinantes a dosis bajas en varios paradigmas experimentales (Meyer y

Caston, 2005; Clark y Dar, 1988; Ghelardini *et al.*, 1997). Sin embargo, dosis altas sí que han demostrado inducir incoordinación motora en ratones (López-Cruz *et al.*, 2011).

El objetivo del presente estudio es explorar el efecto de la cafeína en interacción con etanol en un paradigma de incoordinación motora. Para ello, se realizaran diferentes experimentos con el fin de conocer cuáles son los efectos de estas sustancias por separado, así como, su interacción tras una administración aguda. Por otra parte, se explorará como afecta la cafeína a la coordinación motora tras la administración repetida de etanol.

## Métodos

### a) Sujetos

Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho Swiss CD1 (30-45 g) procedentes de Janvier (Francia). Los ratones fueron estabulados en cajas de tres o cuatro con comida de laboratorio estándar y agua disponible *ad libitum*. La temperatura de la colonia se mantuvo a  $22 \pm 1$  °C con el periodo de luz de 8:00 a 20:00 horas. Todos los procedimientos experimentales cumplían con la European Community Council directive (86/609/ECC) para el uso de animales de laboratorio con el –Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research– (National Research Council, 2003).

### b) Drogas

Todas las soluciones fueron administradas intraperitonealmente (IP). Como vehículo para todas las drogas se utilizó solución salina (0.9 % w/v) que sirvió como control. El etanol (Panreac Química S. A., España) fue disuelto al 20 % (v/v), e inyectado 10 minutos antes del test. La cafeína (Sigma-Aldrich, España) se administró 30 minutos antes del test.

### c) Rotarod

La coordinación motora fue evaluada con un Rotarod (UGO Basile, 7650, Jones & Roberts). Este aparato consiste en una rueda rotatoria que requiere de movimientos coordinados para evitar caer de ella y está dividida en cinco compartimentos individuales de 6 cm. Cada animal se situó en la rueda rotatoria que giraba a una velocidad ascendente de 1 a 10 rpm en incrementos de 1 rpm cada 30 segundos, tarea que requiere la ejecución de movimientos coordinados para evitar caer. Se estableció un punto de corte de 390 segundos por ensayo y se registró el tiempo en el que el animal tardaba en caer de la rueda como índice de incoordinación motora.

### d) Procedimiento conductual

Para evaluar el impacto que tiene la cafeína sobre los efectos incoordinantes producidos por alcohol se realizaron dos tipos de experimentos. Por una parte, se administró una dosis de alcohol (0,0, 0,5 o 1,5 g/kg) más una dosis de cafeína (0, 15 o 30 mg/kg), ambas de forma aguda. A partir de los datos obtenidos en este experimento, se seleccionó la dosis de ethanol que era capaz de inducir incoordinación motora para el siguiente experimento.

En el experimento 2, se llevó a cabo una administración repetida de alcohol (1.5 g/kg) a un grupo o de salina al grupo control, en días alternos durante 5 sesiones. Transcurridos dos días desde el último test, se administró una única dosis de cafeína (0, 15 o 30 mg/kg), tanto a los animales pre-expuestos de forma repetida al etanol, como a los pre-expuestos a salina. El día del test los animales no recibieron ni salina ni etanol.

## Resultados

Experimento 1: Efecto de la administración aguda de cafeína y de etanol sobre la incoordinación motora medida en un rotarod.

Se realizó un ANOVA de dos factores (dosis de cafeína x dosis de alcohol). El factor principal cafeína está compuesto por tres niveles (0, 15 o 30 mg/kg), así como el factor principal alcohol (0, 0,5 o 1,5 g/kg). Este análisis estadístico mostró un efecto significativo del factor alcohol [ $F(2,77) = 0,726$ ,  $p < 0,01$ ], pero no del factor cafeína [ $F(2,77) = 0,950$ , n. s.], ni de la interacción [ $F(4,77) = 1,580$  n. s.] (figura 1).

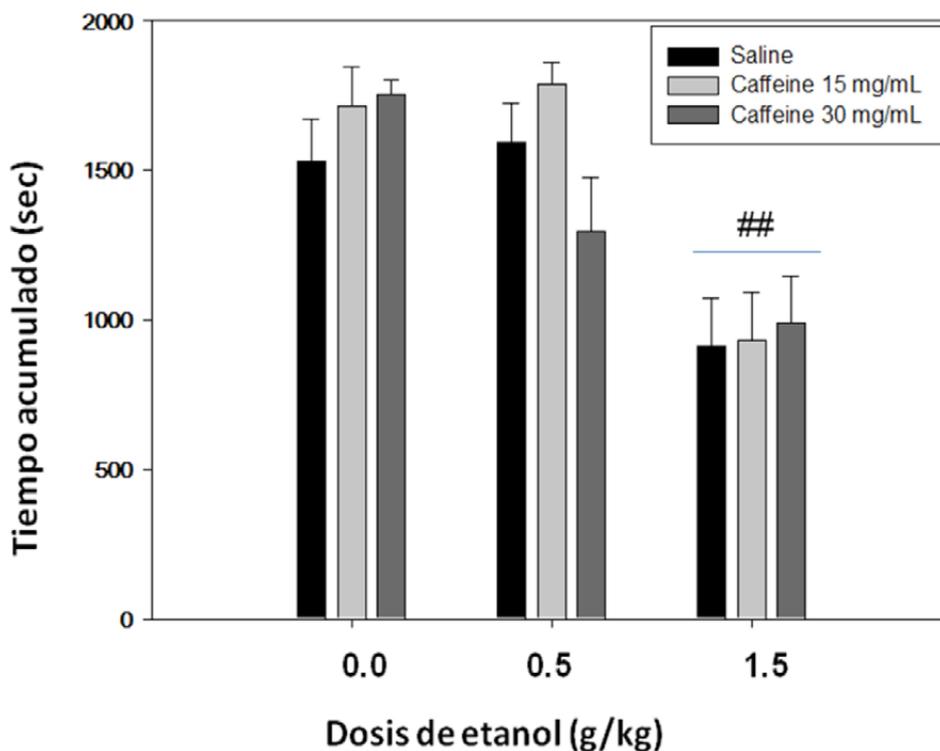


Figura 1. Efecto del alcohol y de la cafeína en la coordinación motora medida en el rotarod. Media  $\pm$  SEM de segundos acumulados en el rotarod durante 5 ensayos. ##  $p < 0.01$  diferencias significativas respecto al grupo control

Experimento 2. A: Efecto de la cafeína sobre la incoordinación motora producida por una administración repetida de etanol.

Un ANOVA factorial de medidas repetidas (sesión x tratamiento) reveló un efecto significativo del factor tratamiento [ $F(1,52) = 19,7547$ ,  $p < 0,01$ ], pero no de las sesiones [ $F(4,208) = 1,9260$ , n. s.]. La interacción entre sesiones y tratamiento también fue significativa [ $F(4,208) = 7,5016$ ,

$p < 0,01$ ] (figura 2). La comparación post hoc mediante la prueba LSD de Fisher mostró que mientras que el grupo que recibió salina repetidamente no cambió a lo largo de las sesiones, el grupo que recibió etanol, a partir de la cuarta sesión redujo significativamente su coordinación en relación al primer día en que recibió etanol ( $p < 0,05$  para la sesión 4 y  $p < 0,01$  para la sesión 5). Además el grupo que recibió etanol difirió significativamente del grupo salina a partir también de la cuarta sesión ( $p < 0,01$ ).

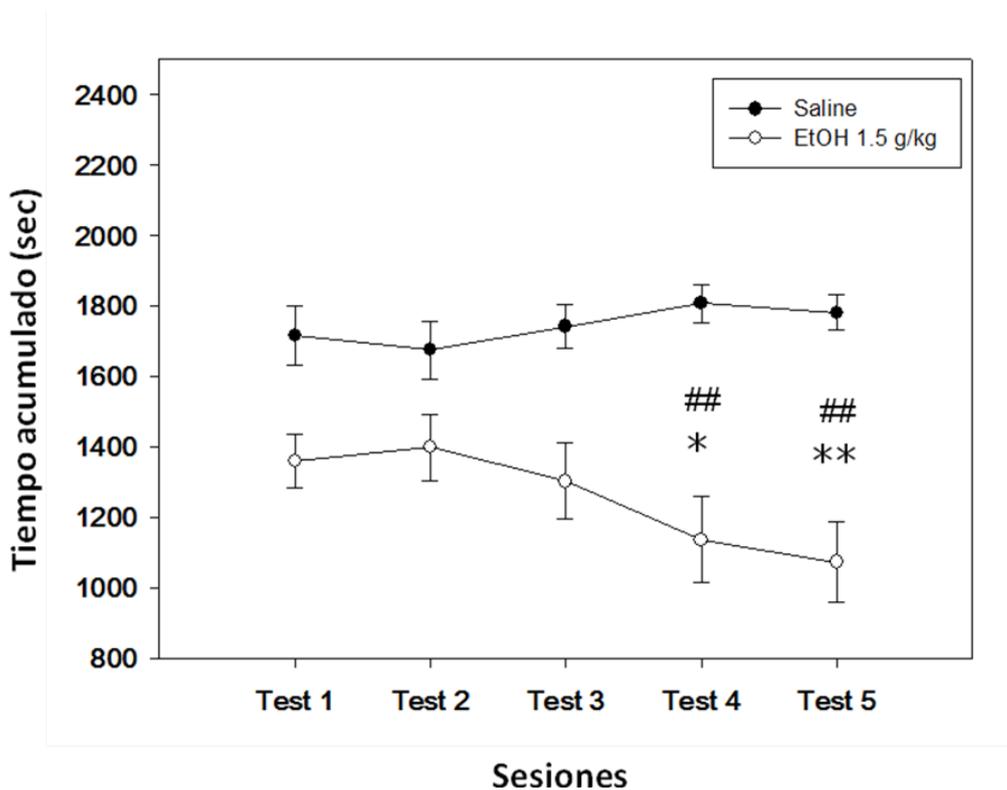


Figura 2. Efecto de la administración repetida de etanol (0,5 g/kg) o de la salina sobre la coordinación motora medida en el rotarod. Media  $\pm$ SEM de segundos acumulados en el rotarod durante 5 ensayos por cada día de Test. \*  $p < 0,01$  diferencias significativas respecto al Test 1 en el mismo grupo. ##  $p < 0,01$  diferencias significativas respecto al grupo control en la misma sesión.

Experimento 2B: Efecto de la cafeína sobre la incoordinación motora potenciada por la administración repetida de etanol.

Un ANOVA de dos factores: pretratamiento (salina o etanol) x dosis de cafeína (0, 15 o 30 mg/kg), reveló un efecto del tratamiento anterior [ $F(1,48) = 4,649$ ,  $p < 0,01$ ]. Sin embargo, no se observa un efecto de la dosis de cafeína [ $F(2,48) = 0,898$ , n. s.] ni de la interacción entre ambos factores principales [ $F(2,48) = 0,195$ , n. s.] (figura 3).

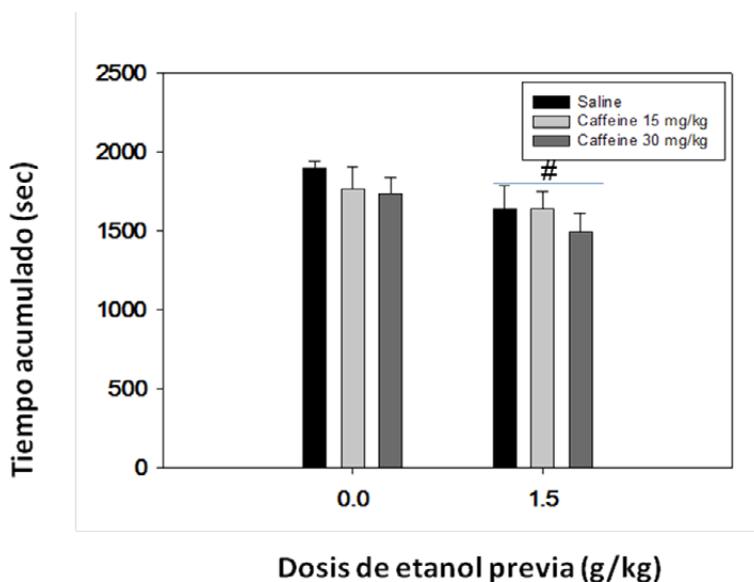


Figura 3. Efecto de la cafeína sobre el pretratamiento con salina o etanol en la coordinación motora medida en rotarod. Media  $\pm$ SEM de segundos acumulados en el rotarod durante 5 ensayos. #  $p < 0,05$  diferencias respecto a los grupos que fueron prexpuestos a salina

## Discusión y conclusiones

Contrariamente a la popular creencia de que la cafeína puede reducir los efectos incoordinantes del alcohol, los estudios presentes demuestran que, independientemente del patrón de administración de alcohol, ya sea agudo o repetido, la cafeína a estas dosis no es capaz de revertir los efectos incoordinantes de esta droga de abuso.

En el primer experimento, se observa cómo la dosis de 0.5 g/kg de alcohol no produce un efecto supresor de la coordinación motora, sin embargo, la dosis de 1.5 g/kg produce una disminución significativa del tiempo que permanecen los animales realizando una conducta de coordinación. Además, las dosis utilizadas de cafeína en nuestro estudio no produjeron un incremento de la coordinación motora en comparación con el grupo control. Es más la administración de cafeína no alteró la incoordinación motora inducida por esta dosis incoordinante de alcohol. Este último resultado entra en contradicción con datos previos (Dar, 1988), en los cuales una dosis aguda de cafeína (20 mg/kg) similar a la utilizada en el presente estudio redujo la incoordinación motora producida por una dosis mayor de alcohol (2 g/kg) en ratones.

En cuanto al segundo experimento, se eligió la dosis de alcohol que deterioró la coordinación motora (1.5 g/kg). Aunque datos con otras estirpes de ratones demuestran que en una administración repetida de alcohol puede producir tolerancia a los efectos incoordinantes del alcohol (Crabbe *et al.*, 1979; Khanna *et al.*, 2002), en la estirpe utilizada en el presente experimento se ha observado una potenciación de la incoordinación motora, es decir, tras varias administraciones de alcohol, la ejecución de los animales es cada vez peor. Además, hemos demostrado que si tras haberse producido esta potenciación de la incoordinación se administra cafeína, la coordinación motora no mejora, sino que tiende a empeorar aunque no a niveles estadísticamente significativos.

El presente conjunto de experimentos requiere ser ampliado con un número mayor de dosis de ambas sustancias ya que es posible que el efecto beneficioso de la cafeína solo se aprecie si las dosis de alcohol son muy altas (mayores de 1.5 g/kg).

Agradecimientos a PND (2010I024), Ministerio de Sanidad.

## Referencias bibliográficas

- Chuck, T. L., McLaughlin, P. J., Arizzi-LaFrance, M. N., Salamone, J. D. & Correa, M. (2006). Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: Sedation, ataxia and bradykinesia. *Life Sciences*, 79(2): 154-161.
- Clark, M. & Dar, M. S. (1988). Mediation of acute ethanol-induced motor disturbances by cerebellar adenosine in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 30(1): 155-161.
- Crabbe, J. C., Rigter, H., Uijlen, J. & Strijbos, C. (1979). Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 208; 128-133.
- Dar, M. S. (1988). The biphasic effects of centrally and peripherally administered caffeine on ethanol-induced motor incoordination in mice. *European Journal of Pharmacology*. 40: 482-487.
- El Yacoubi, M., Ledent, C. M., Parmentier, M., Costentin, J. & Vaugeois, J. M. (2003). Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology*. 45: 977-985.
- Ferré, S. & O'Brien, M. C. (2011). Alcohol and Caffeine: The perfect storm. *Journal of caffeine research*. 2011; 1: 153-162.
- Ferreira, S. E., Quadros I. M., Agatha A. T., Takahashi S. S., Koyama R. G. & Souza-Formigoni, M. O. (2004). Can energy drinks reduce the depressor effect of ethanol? An experimental study in mice. *Physiology Behavior*. 82: 841-847.
- Fredholm, B. B., Bätting, K., Holmén, J., Nehlig, A. y Zvartau, E. E., (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51, 83-133.
- Ghelardini, C., Galeotti, N. & Bartolini, A. (1997) Caffeine induces central cholinergic analgesia. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 356(5):590-595.
- Hasenfratz, M., Bunge, A., Dal Para, G. & Battig, K. (1993). Antagonistic effects of caffeine and alcohol on mental performance parameters. *Pharmacol Biochem Behav.*, 46, 463-465.
- Khanna J. M., Morato, G. S. & Kalant, H. (2002). Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*. 72, 291-298.
- López-Cruz, L., Pardo, M., Dosda, A., Salamone, J. D. & Correa, M. (2011). Comparison between high doses of caffeine and theophylline on motor and anxiogenic effects in CD1 mice: studies of acute and chronic administration. *Behavioural Pharmacology*. 22: 71-72.
- Meyer, L. & Caston, J. (2005). Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57Bl6/J male mice. *Brain Research*. 1039:171-176.
- Olah, M. E. & Stiles, G. L. (2000). The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol Therapy*, 85(2), 55-75.
- Pardo, M., López-Cruz, L., Valverde, O., Ledent, C., Baqi, Y., Müller, C. E., Salamone, J. D. & Correa, M. (2013). Effect of subtype-selective adenosine receptor antagonists on basal or haloperidol-regulated striatal function: studies of c-Fos expression and exploratory locomotion in outbred and A2AR KO mice. *Behavior Brain Research* (en prensa).
- Prediger, R. D., Batista, L. C. & Takahashi, R. N. (2004). Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology*. 499:147-154.
- Reissig, C. J., Strain, E. C. & Griffiths R. R. (2009). Caffeinated energy drinks —a growing problem. *Drug Alcohol Dependence*. 99: 1-10.