

00361  
4  
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CUANTIFICACION Y LIBERACION IN VITRO DE ENCEFALINAS EN EL CEREBRO  
DE RATAS TRATADAS EN FORMA CRONICA Y AGUDA CON ETANOL.

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
(Biología Celular)

PRESENTA: OPB MIGUEL ASAI CAMACHO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### Resumen

I. Introducción.....	2
1.1.0. Efectos del etanol en el Sistema Nervioso Central....	3
1.1.1. Efectos en membrana.....	3
1.1.2. Efectos en proteínas de membrana.....	6
1.1.3. Alteraciones Intracelulares.....	6
1.2.0. Efectos del Etanol sobre Opioides y Receptores Opiáceos.....	9
1.2.1. Liberación de Encefalinas.....	16
II. Planteamiento del Problema e Hipótesis.....	20
III. Material y Métodos.....	23
3.1. Administración Crónica de Etanol.....	24
3.2. Administración Aguda de Etanol.....	25
3.3. Liberación <i>in vitro</i> de encefalinas.....	25
3.4. Cuantificación de Etanol en Sangre.....	28
3.5. Disección de las Estructuras Cerebrales.....	30
3.6. Cuantificación de Encefalinas.....	30
IV. Resultados.....	32
V. Discusión.....	36
VI. Referencias.....	46

## RESUMEN

Ha sido evidente que el consumo irracional del etanol por el hombre, le produce graves y severas modificaciones en todo el organismo, para culminar con los cuadros de tolerancia y adicción. Durante décadas, el mecanismo de acción del etanol se consideró inespecífico, debido a que modificaba la permeabilidad de la membrana sin determinarse la zona o tipo de moléculas sobre las cuales actuaba.

El uso de nuevas técnicas analíticas, han demostrado la existencia de microdominios membranales de particular sensibilidad al etanol; aunado a efectos selectivos en receptores y enzimas asociadas a segundos mensajeros en la membrana, lo cual ha permitido estudiar los mecanismos de acción del etanol en áreas más restringidas y selectivas.

El etanol también produce inhibición de la síntesis de proteínas con efectos más severos en las proteínas de secreción. Las encefalinas, de naturaleza peptidérgica, pueden ser afectas por la presencia del etanol. Existen evidencias que sugieren que la liberación de encefalinas, pueden estar involucradas con el coma producido durante la ingestión aguda de alcohol por el hombre.

El presente trabajo estudia los efectos de la administración en forma crónica y aguda del etanol sobre la concentración de encefalinas en la amígdala, cuerpo estriado, hipocampo e hipotálamo de la rata. Además se analiza la liberación *in vitro* de met-encefalina del cuerpo estriado en los mismos modelos experimentales.

En los experimentos crónicos se administró etanol por vía oral como única fuente de líquidos, a concentraciones crecientes del 5, 10 y 20 % diluido en agua, durante 15 días en cada dosis. En los ensayos agudos se inyectó etanol por vía intraperitoneal, a una dosis de 3 g/kg. Los experimentos de liberación *in vitro* se realizaron en rebanadas del cuerpo estriado en los mismos modelos experimentales.

Los resultados, demuestran claramente el efecto del etanol sobre la concentración de encefalinas y su liberación. El etanol reduce significativamente el contenido tisular de encefalinas en el paradigma crónico y agudo, para retornar a valores similares al control en función del tiempo. La liberación de Met-encefalina no es significativa durante el alcoholismo crónico, lo cual sugiere la inhibición de la síntesis de proteínas, sin modificar la liberación. En el modelo agudo el trabajo demuestra una liberación masiva de Met-encefalina, a los 2 y 5 minutos de haber sido administrado. A tiempos más largos la liberación es similar al control. La reducción de la concentración de met-encefalina en el tejido y el incremento de su liberación en el modelo crónico nos permite sugerir que puede participar en el coma inducido por el alcohol.

Los resultados de concentración no son iguales para todas las estructuras analizadas, en el hipocampo la Leu-encefalina no modifica su contenido. Este efecto puede reflejar un comportamiento diferencial en la biosíntesis y liberación de cada péptido dependiendo de la estructura analizada.

**CUANTIFICACION Y LIBERACION IN VITRO DE ENCEFALINAS EN EL CEREBRO  
DE RATAS TRATADAS EN FORMA CRONICA Y AGUDA CON ETANOL**

## I. INTRODUCCION

El alcoholismo representa en muchos países del mundo, incluido México, uno de los más importantes problemas de salud pública. A lo largo del tiempo se han realizado, un gran número de trabajos, que analizan los efectos causados por el etanol en órganos periféricos, principalmente en el hígado, además de los trabajos de índole psiquiátrico, social y epidemiológico.

El examen detallado de los mecanismos por los cuales el etanol produce la intoxicación aguda, los efectos sedantes, el desarrollo de la tolerancia y dependencia física y en general el daño causado al cerebro desde el nivel genético, bioquímico y neuroquímico, no han podido hasta el momento ser establecidos.

Una seria desventaja para el estudio de las patologías causadas por el etanol, en comparación con los no menos problemáticas de la morfina y heroína, es el hecho de que el etanol no tiene un receptor específico como el resto de las drogas psicotrópicas y que su metabolito, el acetaldehído es un derivado más tóxico que el etanol mismo. El mecanismo de acción del etanol, fue considerado hasta hace pocos años como inespecífico, el uso de nuevas técnicas analíticas ha permitido restringir el lugar y el tipo de modificación producidos por el etanol, para comenzar a hablar de mecanismos de acción específicos principalmente en la membrana citoplásmica.

El etanol atraviesa la barrera hemato-encefálica y alcanza la membrana neuronal en segundos, modificando su estructura y propiedades fisicoquímicas, los cambios en membrana alteran el microambiente que rodea a los receptores de los neurotransmisores localizados en la membrana citoplásmica y a las enzimas que regulan la función de los mismos. Además de alterar la función de los receptores, el etanol penetra a la célula para modificar la síntesis, recambio ó liberación de algunos neurotransmisores. El etanol también inhibe la síntesis de proteínas, esta última abarca a las hormonas de secreción de origen proteínico y a los neurotransmisores putativos como los péptidos opioides.

La magnitud de los cambios varían en función de la estructura cerebral, de la concentración de etanol utilizada, del modo de administración y del tiempo en el cual las determinaciones cuantitativas fueron realizadas.

En la introducción se analiza con mayor detalle las alteraciones mencionadas, para finalizar con la relación etanol-encefalinas, tema central del presente trabajo.

## **1.1 EFECTOS DEL ETANOL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

### **1.1.1. Efectos en Membrana**

Los depresores no específicos del Sistema Nervioso Central (SNC), disminuyen la excitabilidad neuronal (120), sin embargo

poblaciones neuronales específicas requieren de una concentración particular del depresor para alterar sus funciones de membrana (121). El alcohol está clasificado dentro de este grupo. El etanol, como propuso Meyer (85) desde principio de siglo, modifica las propiedades fisiológicas de las membranas neuronales a través de mecanismos inespecíficos. Esta "hipótesis de membrana" fue ampliamente aceptada durante varias décadas. En los últimos años con el desarrollo de nuevas técnicas, como la Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE), se ha podido establecer que dosis muy bajas de etanol (25-100 mM) incrementan en forma significativa la fluidez de la membrana. Este dato se correlaciona con el efecto sedante producido por el etanol (24,25,45). Para contrarrestar el cambio en la fluidez, la célula inserta moléculas de colesterol en la membrana (58). Estas respuestas se han interpretado como el mecanismo inicial que puede explicar el desarrollo de la tolerancia y/o de la dependencia física al etanol (39,40,41).

El etanol puede incluirse en las capas lipídicas y alterar la movilidad lateral de los lípidos de membrana o interactuar con las porciones hidrofóbicas de las proteínas de membrana y provocar cambios en la conformación estérica de las proteínas (122). El etanol e inclusive los alcoholes alifáticos junto con los anestésicos, se pueden solubilizar con los lípidos de la



membrana celular esta propiedad puede suprimir varias funciones biológicas (112).

La actividad de las enzimas unidas a membrana guarda un equilibrio con la cantidad y naturaleza química de los lípidos que integran la membrana, por ejemplo, moléculas de gangliósidos al ser añadidas a preparaciones de bicapas con fosfolípidos, incrementan la fluidez de membrana (44). cambios de esta naturaleza, pueden modificar conformacionalmente el sitio activo de las enzimas o lugares cercanos a éste. Preparaciones de membrana, del cerebro de ratones sometidos a dosis bajas de etanol en forma crónica, son relativamente resistentes a incrementar la fluidez de sus membranas por el efecto del etanol. La continua exposición a un agente que afecta la fluidez de membrana, genera un estímulo adaptativo al cambiar la estructura de membrana y su función. El etanol no sólo modifica la fluidez de la membrana, también aumenta su tamaño (42). Concentraciones de etanol que causan un bloqueo de las fibras nerviosas, expanden la membrana en el orden de un 2 a 3 %. El incremento del volumen de la membrana es 10 veces más grande que el volumen de etanol incluido en la membrana. En preparaciones de liposomas (preparaciones libres de proteínas), el efecto no fue observado, por lo cual se ha sugerido que el etanol al modificar la matriz lipídica, produce cambios en la conformación de las proteínas en consecuencia el volumen de la membrana aumenta (42).

### 1.1.2. Efectos en proteínas de membrana

Las membranas neuronales están compuestas por mezclas heterogéneas de lípidos y proteínas, esta propiedad puede producir determinados arreglos o áreas de sensibilidad diferencial al etanol y dar lugar a "microdominios" dentro de la estructura de membrana con una composición particular de lípidos y proteínas. Los lípidos más importantes que conforman la membrana celular de las neuronas como gangliósidos, fosfolípidos y colesterol, contribuyen a determinar la sensibilidad de la membrana al etanol.

La localización de regiones específicas dentro de la estructura de membrana que tienen una particular sensibilidad al etanol, sugiere la existencia de proteínas unidas a éstas (26), las cuales para manifestar su actividad óptima dependen de los lípidos que las rodean, así las proteínas pueden ser selectivamente sensibles al etanol. La respuesta de receptores, ionóforos y enzimas en conjunto pueden dar lugar a los cambios neurofarmacológicos debidos al etanol (32).

### 1.1.3. Alteraciones Intracelulares

Cualquier psicotrópico que logre alterar la síntesis de proteínas, puede modificar substancialmente la homeostasis celular. El etanol desafortunadamente tiene esta propiedad.

Varios autores han reportado que la ingestión crónica de etanol disminuye significativamente la síntesis proteínica, en condiciones tanto in vivo como in vitro (92,126). La ingesta crónica de etanol ( 7 semanas ) a una dosis del 10 % en agua, reduce la incorporación de 3H-Leu a la síntesis ribosomal en el cerebro de la rata. El efecto en animales llevados a la dependencia física, con dosis crecientes de etanol desde los 5 g/kg hasta los 10 g/kg, por vía intragástrica inhibe la síntesis de proteínas en forma más severa (60).

Se ha descrito la existencia de ribosomas libres y unidos a membrana. Los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico son responsables de la síntesis de proteínas para secreción, los ribosomas libres participan en la síntesis de proteínas de uso intracelular (108). Tomando en cuenta esta diferencia, se ha observado que los efectos del etanol en las diferentes poblaciones de ribosomas no son iguales.

Al aislar los ribosomas libres y unidos a membrana, provenientes de animales sometidos al etanol en forma crónica, se encontró un mayor efecto del etanol sobre los polisomas libres, al inhibir significativamente su capacidad para incorporar a la síntesis proteica la 3-H-Leu (2), en comparación con los polisomas unidos a membrana (117).

Las alteraciones intracelulares del etanol causadas en los

neurotransmisores, son contradictorias. Varios reportes señalan que una sola inyección de etanol, reduce el contenido cerebral de norepinefrina (NE) y de serotonina (61). Estudios inmunohistoquímicos (27) y mediciones cuantitativas de NE señalan que el etanol incrementa su recambio (3,52). Efectos contrarios también han sido reportados. Thadani (129) encuentra que el etanol administrado por vía intracerebroventricular (i.c.v.), reduce el recambio de 3H-NE en el cerebro de la rata. La resepina, alfa-metil-dopa y la alfa-metil-p-tirosina prolongan significativamente, en el ratón, el sueño producido por el etanol (82).

Una posible explicación es que el etanol al metabolizarse y producir acetaldehído sea este último el causante de la liberación de NE, se ha demostrado que el acetaldehído es un buen agente liberador de catecolaminas (29,129). El caso de la dopamina apunta hacia resultados similares, una dosis única de etanol, reduce su contenido cerebral (109) y un aumento en su recambio (17,18). Por el contrario, otros autores han reportado que no existen cambios en la concentración tisular de dopamina cerebral (90) y tampoco modificaciones en su recambio y liberación por la presencia de etanol (53).

Estos resultados son difíciles de explicar, sobre todo si se considera la diferencia entre las concentraciones de etanol utilizadas, su vía de administración, la cepa de los animales y el tiempo en el cual las mediciones fueron realizadas.

## **1.2. Efectos del etanol sobre opioides y receptores opiáceos**

El etanol y los narcóticos, desarrollan tolerancia y dependencia física. Estas características han influido notablemente en el interés de muchos grupos de investigación por estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales se producen las alteraciones mencionadas.

Es necesario recordar que el ímpetu inicial, después del descubrimiento de las encefalinas por J. Hughes en 1975, fue estudiar los mecanismos de tolerancia y adicción a los narcóticos, los investigadores encontraron en los opioides una sólida herramienta endógena para abordar el estudio de la adicción. Los mecanismos de acción de los opiáceos y el etanol difieren entre sí, varios laboratorios de investigación han analizado la relación etanol-opioides y etanol-receptores opiáceos. Con el propósito de ubicar al lector en el campo de los péptidos opioides se resume a continuación las características sobresalientes de los mismos.

La historia del descubrimiento de las encefalinas está ahora bien documentada (1,87,130). El receptor opiáceo descubierto por los doctores Pert y Snyder en 1973 (101), llevó a la pregunta del significado biológico de un sitio de enlace estereoespecífico para los narcóticos, compuestos no producidos por el organismo. La posibilidad de un ligando endógeno para los receptores

opíáceos, hasta el momento desconocido, fue discutido y posteriormente se identificó actividad opioide en el tejido neural del ganado porcino (50,51,118). Los métodos de detección fueron ensayos biológicos y los de radioreceptor. Rápidamente se conoció la química de éstas sustancias, las cuales resultaron ser 2 moléculas de naturaleza peptidérgica con la siguiente secuencia: NH<sub>2</sub>-Tyr-gly-gly-phe-met-COOH denominada Metionina-Encefalina (ME) y NH<sub>2</sub>-Tyr-gly-gly-phe-leu-COOH denominada Leucina-Encefalina (LE).

Estos dos pentapéptidos fueron sintetizados y el material probado en bioensayos en la vasa deferente del ratón y en el íleo de cobayo, la actividad opioide de ambos péptidos fue muy grande. Ambas encefalinas presentaron diferente respuesta en la misma preparación, lo cual sugería que la población de receptores no era homogénea, es decir podría existir más de un tipo de receptor con diferente afinidad para las encefalinas.

La caracterización bioquímica del receptor opíáceo no ha cesado desde hace más de 15 años. Sus propiedades generales se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. El receptor es de naturaleza proteínica (99), de alta afinidad, saturable, con sitios de unión estereoespecíficos que pueden ser marcados usando diversos ligandos, tanto agonistas (3H-dihidromorfina), como antagonistas (3H-naloxona, 3H-difrenorfina) así como por ligandos opíoides (3H-D-Ala-2-D-Leu-

encefalina), (3H-D-Ala-Met-NH<sub>2</sub>-Encefalina). En general, la distribución de los sitios de unión es muy consistente con la concentración de sus ligandos. Sin embargo, existe una distribución diferencial de los sitios medidos con un ligando del tipo de la LE.

2. Para determinar una segunda propiedad, se hizo la pregunta de ¿cuántos tipos de receptores pueden existir?. Martin propuso 3 diferentes categorías basado en el análisis de los efectos de los narcóticos en la preparación espinal crónica en el perro. Estas categorías fueron descritas como los receptores, mu, kappa, sigma (37,80,81). Los agonistas típicos de cada grupo pueden ser la morfina (receptores mu), para la etilcetociclazocina (receptores kappa), y la N-alil-norciclazocina (receptores sigma). El efecto diferencial de los péptidos opioides y de los narcóticos en el ileo de cobayo y en la vasa deferente del ratón, hizo proponer a Kosterlitz y col. (68), la existencia de una cuarta categoría de receptores, denominado delta, con un agonista estable en la molécula de (D-Ala-2-D-Leu-5-encefalina) o la LE por si misma. Es necesario señalar que no todas las modificaciones en los agonistas de Met y Leu-encefalina conservan la misma especificidad para los receptores delta. La mayoría de ellas tienden a bloquear la actividad delta y aumentan el mu.

3. Una tercera característica se basa en el uso de las propiedades de los receptores para estudiar las bases moleculares de la acción de los opiáceos.

Moléculas pequeñas y iones poseen efectos específicos al interactuar los agonistas opiáceos con su receptor. Por ejemplo, los iones sodio a concentraciones fisiológicas de 100 mM reducen la afinidad de los agonistas opiáceos por su receptor, los iones manganeso por el contrario aumentan dicha afinidad (102).

Un segundo tipo de efecto puede ser visto por la acción de los nucleótidos guanilados. En el caso del GTP o del Gpp(NH)p, (análogo no hidrolizable del GTP), también reducen la afinidad de los agonistas por su receptor. El efecto del GTP indica que un receptor en particular está unido a la enzima adenilato ciclasa (11,12).

4. Los receptores opiáceos, como la mayoría de los receptores en membrana citoplásmica, presentan el efecto de "down regulation" (regulación a la baja) y de "up regulation" (regulación a la alta), es decir que el número de receptores aumenta o disminuye de acuerdo a la concentración del ligando presente para modular la respuesta. Los trabajos de Bardo (4), y Tempel (125), demostraron el efecto de regulación a la baja al añadir en forma repetida naloxona a cultivos de células. Chang (23) y Law (69), observaron el fenómeno contrario, al aplicar en forma sostenida péptidos opiáceos a células de neuroblastoma. Utilizando el modelo del electroshockconvulsivo (ESC), el cual libera grandes cantidades de encefalinas, se observó el fenómeno de regulación a la alta (69).



La distribución anatómica de los receptores opiáceos, puede ser analizada con la técnica de autorradiografía, la cual señala su localización en las diferentes estructuras y permite sugerir su significado funcional. Varios autores (14,21,22,72,91) estudiaron la distribución de los receptores, la cual como en el caso de los ligandos resultó muy extensa.

Los receptores mu predominan en varios núcleos hipotalámicos y talámicos, en la sustancia gris periacueductal, núcleos interpedunculares, colículo inferior y en los núcleos del rafe medio. Los receptores delta aparecen en proporciones importantes en la amígdala, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio y núcleo pontino. La interpretación de los estudios de autorradiografía, así como los ensayos de unión ordinarios son muy complejos, por el uso de ligandos parcialmente selectivos para unir a su receptor lo cual no permite definir con claridad sus características farmacológicas.

La presencia de múltiples receptores opiáceos no significa necesariamente que tengan una única relación ligando-receptor, como sucede con los diversos receptores descritos para la acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina e histamina.

Paralela a la caracterización del receptor opiáceo, la bioquímica de los procesos biosintéticos que dan lugar a las encefalinas, creció también de manera significativa.

La Met-enkefalina se encontraba inserta en un fragmento de una proteína identificada en 1965 por Chao Hao Li en la Universidad de San Francisco (74), a la cual su descubridor denominó betalipotrofina (b-LPH), la proteína poseía baja actividad en la remoción de los lípidos, esta propiedad no interesó a nadie en particular y su estudio quedó prácticamente abandonado.

Hacia 1976 se estableció que la ME formaba parte de los residuos 61-65 de la b-LPH, lo que despertó el interés de diversos grupos de investigación, quienes probaron inmediatamente la actividad opioide de la proteína, el resultado, como era de esperar, mostró alta actividad opioide (16). La fracción 61-91 de la b-LPH es ahora conocida como beta-endorfina.

Uno de los rasgos más excitantes fue comprender que se podían generar diversas moléculas como la ACTH, b-LPH, beta-endorfina, a partir de un precursor proteínico común. Hipótesis que a la postre fue demostrada por Mains y col. (79) quienes descubrieron una glucoproteína de un peso molecular aproximado a 30,000 D y que contenía en su secuencia a las moléculas antes mencionadas. Esta proteína se conoce como Proopiomelanocortina (POMC). La posibilidad en su momento muy razonable de que la ME fuera el producto final del metabolismo de la b-LPH encontró pronto realidades diferentes. Principalmente por la discrepancia entre la distribución de los receptores tanto para la ME como para la b-endorfina, la diferencia de concentración entre ambas y por

último que en la secuencia de la b-endorfina y de toda la POMC, no se encontraba una sola copia de Leucina-encefalina.

La búsqueda del origen biosintético de LE como de ME produjo una auténtica explosión de datos de carácter bioquímico, los cuales culminaron con la identificación de otras dos pre-proteínas, de peso molecular muy parecido a la POMC, una de ellas la Proencefalina A (73,94), cuya secuencia de nucleótidos contiene en su estructura 4 copias de ME, una copia del Heptapéptido (ME-arg-fen), una copia del Octapéptido (ME-arg-gli-leu) estos 2 últimos posibles precursores de la met-encefalina y una copia de Leucina-encefalina.

Rápidamente se pudo dilucidar la secuencia de nucleótidos que producen una tercera pre-proteína denominada Proencefalina B o Prodinorfina (59), la cual da lugar a las moléculas genéricamente conocidas como dinorfinas, las cuales en su secuencia siempre se encuentra una copia de Leucina-encefalina. La prodinorfina no contiene una sola copia de Metionina-encefalina. A partir de los 3 precursores descritos, se han aislado, purificado y caracterizado, más de 20 péptidos de potente actividad opioide (inclusive mucho mayor a la de las encefalinas mismas) y cuya distribución es tan amplia, que podemos encontrarlas prácticamente en todo el SNC.

Los procesos biosintéticos que gobiernan la producción de

todos los péptidos, son desconocidos y complejos, en principio porque se desconoce la(s) enzimas que regulan la producción de los péptidos en los diferentes tejidos, esto produce que la relación ME/LE sea diferente para cada estructura cerebral u órgano periférico analizado.

#### 1.2.1. Liberación de Encefalinas

El concepto de "liberación de un neurotransmisor" desde la perspectiva cuantitativa, puede arrancar desde la década de los 50's, con los trabajos de Bernard Katz (64), Fatt (33) y Del Castillo (28). Los autores estudiaron la preparación de fibras musculares, las cuales liberan Acetil Colina (ACh), neurotransmisor responsable de la contracción muscular en la placa motora terminal.

Katz describe: las terminales nerviosas motoras aún en "reposo", se encuentran en un estado intermitente de actividad secretora, al liberar pequeñas cantidades de ACh a determinados intervalos, con un promedio de un evento de liberación por segundo. Un impulso nervioso causa que esta actividad sea de enorme intensidad durante un tiempo muy corto, es como si un ciento de estos eventos de liberación se sincronizaran para manifestarse en forma simultánea en un tiempo de un milisegundo."

Los autores cuantifican el material liberado en forma

espontánea, cuando la membrana está en reposo. Katz establece su concepto de liberación cuántica, término usado para describir la naturaleza de la luz, y establece que la célula libera cantidades discretas y constantes de neurotransmisor al espacio sináptico. La suma de los quanta de neurotransmisor puede producir la despolarización de la membrana postsináptica.

En este contexto se establece la función del calcio, catión esencial para que la despolarización se lleve a cabo, el calcio al entrar a la célula cambia la permeabilidad de la membrana y produce la entrada de potasio y salida de sodio componentes necesarios para generar el potencial de acción.

Las condiciones de una membrana en reposo, así como su liberación cuántica (basal) pueden ser modificadas experimentalmente tanto in vivo como in vitro con agentes despolarizantes, como el potasio y la veratridina principalmente. Por el momento, se acepta que el estudio de la liberación de un neurotransmisor debe estar sujeto a la presencia de calcio y a la acción de un agente despolarizante. Las concentraciones y el tiempo de exposición dependen de la preparación utilizada.

La distribución subcelular de las encefalinas ha sido estudiada por varios autores (119,97), quienes localizaron a estos péptidos en la fracción sinaptosomal principalmente. La liberación in vitro de las encefalinas a partir de rebanadas de

tejido cerebral es una preparación en donde la organización morfológica se conserva. También se ha estudiado la liberación in vivo de las encefalinas con la introducción de un sistema de canulación en áreas específicas del cerebro y con veratridina y potasio como agentes despolarizantes que inducen su liberación.

Los primeros estudios por parte de Henderson y col. (47), reportaron la liberación de met- y leu-encefalina de rebanadas de tejido y de sinaptosomas, tanto en conejo como en cobayo. En el mismo año (56,5) se describió la liberación de met-encefalina del globus pallidus de la rata. Estos resultados fueron corroborados y extendidos a la Leu-encefalina (76,95,96,110,113). Con el sistema de canulación in vivo (push-pull), se encontraron datos similares en el globus pallidus del gato (19), y de la rata (6).

Todos estos trabajos, han demostrado que la liberación de encefalinas es un proceso dependiente de calcio. Por lo tanto se asume que éstos péptidos se comportan en forma similar a los neurotransmisores descritos en el SNC.

Los datos sobre la regulación de la liberación de encefalinas, provienen del grupo de Osborne y col. (95), quienes encontraron que el único compuesto que regula inhibitoriamente la liberación in vitro de Met-encefalina en el cuerpo estriado de la rata, es el ácido gamma amino butírico (GABA). No se observaron efectos de otros neurotransmisores o drogas. Por otra parte, Bourgoin (15),

en experimentos in vivo en el globus pallidus del gato, reportó el mismo efecto inhibitorio con el GABA y una respuesta opuesta con su antagonista, la bicuculina. Estos autores sugieren que el efecto es mediado por los receptores gabaérgicos.

A partir de la década de los 80's, se ha vinculado a las encefalinas con el etanol. Los estudios iniciales de Hiller y col. (48) señalan que el etanol inhibe el enlace de las encefalinas sobre sus receptores. Esta inhibición fue selectiva, al reducir la afinidad por el receptor tipo delta, el receptor mu no tuvo modificaciones (123). Este es un primer trabajo en donde se señalan cambios diferenciales del etanol sobre un sistema en particular. Si bien el experimento se realizó en cerebro completo, Hynes (54) obtuvo resultados similares en el núcleo caudado del ratón. La naturaleza de la inhibición es de carácter competitivo (214).

Recientemente 2 grupos de investigación (8,107), encontraron que los cambios en la afinidad de las encefalinas por sus receptores, pueden ser consecuencia de los cambios conformacionales que produce el etanol sobre los ligandos endógenos met- y leu-encefalina. Los autores señalan que el etanol modifica la estructura secundaria de los ligandos naturales, sus derivados sintéticos tienen una estructura rígida y no son afectados por el etanol.

Los cambios producidos por el etanol en la fluidez de membrana, en los receptores opiáceos o las alteraciones conformacionales, pueden dar lugar a una liberación masiva de encefalinas durante la intoxicación producida por el etanol (57).

En general los trabajos que vinculan a los opioides con el etanol, reportan disminuciones en la concentración de los péptidos opioides de diferente magnitud. Blume y col. (13) encontraron reducida la cantidad de LE en los ganglios de la base del hamster después de ser sometido al etanol en forma crónica. Péptidos derivados de la prodinorfina, como la dinorfina 1-8 y la alfa-neo-endorifina, reducen su concentración en hipófisis de la rata después de la exposición aguda y crónica con etanol (115). Holt y Herz reportan reducciones significativas de beta-endorfina en el cerebro del ratón después de la administración aguda y crónica con etanol (49).

Estos trabajos en su conjunto muestran cambios en moléculas que representan a los 3 sistemas opioides antes descritos. Al parecer el etanol, modifica las concentraciones de los opioides durante la intoxicación aguda y durante el tratamiento crónico.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS**

El etanol fue considerado durante varias décadas, un fármaco cuyo mecanismo de acción era inespecífico. Si bien su blanco era la membrana celular, no se discernía la porción o tipo de moléculas sobre las cuales actuaba.



Durante los últimos años, se han podido establecer "microdominios," arreglos específicos de lípidos y proteínas en la membrana de particular sensibilidad al etanol, los cuales pueden modificar la función de los receptores, ionóforos o enzimas asociados a membrana.

La inhibición selectiva y competitiva del etanol sobre los receptores delta y mu, puede representar una primera característica específica del etanol sobre un sistema endógeno en particular.

El sitio de acción del etanol, rebasa los límites de la membrana y puede interferir con varios mecanismos intracelulares como la síntesis de proteínas.

La inhibición de la síntesis de proteínas de exportación, como de uso intracelular es transitoria, es decir retorna a valores control después de retirado el etanol.

Desafortunadamente, las características fisicoquímicas del etanol y de su metabolito el acetaldehído, los capacitan para interaccionar y modificar diversas funciones celulares y de alterar la homeostasis celular. La presencia sostenida del etanol en el organismo produce el desarrollo de tolerancia y dependencia física.

Las alteraciones del etanol en el sistema opioide son prácticamente desconocidas, los datos existentes abordan

esencialmente su interacción con sus receptores y solo existen reportes que estudian la concentración de opioides en el cerebro. Se ha propuesto, que si el etanol administrado en forma aguda reduce la concentración tisular de encefalinas puede ser a consecuencia de su liberación del tejido en forma masiva.

La relación directa entre la concentración-liberación de encefalinas es desconocida.

El efecto del etanol administrado en forma crónica y aguda sobre la concentración de encefalinas en la amígdala, estriado, hipotálamo e hipocampo no ha sido estudiada. Tampoco se conoce si la liberación de encefalinas se modifica a consecuencia del etanol en los mismos modelos experimentales.

El presente trabajo propone las siguientes hipótesis :

1. La administración de etanol en forma crónica, inhibe temporalmente la síntesis de proteínas, tanto de exportación como de uso intracelular. Es posible que el etanol administrado en forma crónica, reduzca la concentración de met- y leu-encefalina en el cerebro de las ratas. Estas concentraciones podrían retornar a valores semejantes al control una vez retirado el etanol.

2. La intoxicación aguda con etanol, produce una rápida disminución del contenido de varios neurotransmisores y de proteínas del sistema opioide, sin interferir con su síntesis. La

administración aguda de etanol en diversas estructuras del cerebro, podría reducir significativamente el contenido de encefalinas. Como en el primer inciso se podría retornar a valores semejantes al control una vez retirado el etanol.

3. El tiempo necesario para producir una proteína de exportación no es menor a 3 horas. El efecto agudo se manifiesta a los pocos minutos de administrado el etanol. Si existe una disminución en el contenido de encefalinas, puede ser debido a un incremento en su liberación de sus terminales nerviosas.

Los experimentos planteados para contestar las hipótesis enunciadas son:

1. Cuantificación de encefalinas en el cerebro de la rata sometida al etanol en forma crónica. Retirar el etanol y analizar el contenido de encefalinas 24 horas después.

2. Cuantificación de encefalinas a tiempos cortos después de la administración de etanol en forma aguda.

3. Cuantificación de la liberación *in vitro* de Met-enkefalina, tanto en el modelo crónico como en el agudo.

4. Cuantificación del contenido de etanol circulante para cada uno de los 3 primeros incisos.

### III. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 250-300 g de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de

temperatura e iluminación ( $23 \pm 1$  C. con 12 horas de iluminación comenzando a las 06:00 a.m.), el agua y el alimento para los animales control fue proporcionado ad libitum. Cada una de las ratas control y experimentales se pesaron y agruparon al azar en cajas de acrílico con un total de 5 animales por caja.

#### Reactivos Empleados

3-H-Met-encefalina 250 micro Ci/mmol, 3-H-Leu-encefalina 250 micro Ci/mmol. (New England Nuclear). Encefalinas sintéticas no radioactivas de Peninsula Lab. Prueba de etanol en sangre, Sigma Chemical Company. Kit 332 UV. Etanol Absoluto, Merck México. Reactivos grado analítico.

#### 3.1. Administración Crónica de Etanol

A un grupo de ratas se les administró una mezcla de etanol-agua como única fuente de líquidos en las siguientes concentraciones 5, 10 y 20 % de etanol durante 15 días en cada dosis. Un grupo de animales se sacrificó por decapitación, y su sangre fue recolectada del tronco de la rata el último día de administración de etanol al 20 % (a 45 días de haber iniciado la ingesta de etanol a concentraciones crecientes).

Se evaluó diariamente la cantidad de etanol ingerido (reportado en gramos) y el peso corporal de las ratas cada 15

días. Una caja control (sin ratas) fue manipulada igual a las demás para conocer la pérdida de líquido por el movimiento. La pérdida promedio fue de 5 ml. y se sustrajo al valor del volumen ingerido por el resto de las cajas experimentales.

### 3.2 Administración Aguda de Etanol

A un grupo de ratas se les inyectó etanol absoluto (densidad=0.789 kg/l), por vía intraperitoneal a una dosis de 3 g/kg de peso. Para evitar lesiones intraperitoneales debidas a la presencia de etanol puro, antes de cada inyección se aforó con agua dentro de la jeringa a un volumen de 3 ml. Los animales se sacrificaron a los 10, 20, 40 y 80 min después de ser inyectados y su sangre fue recolectada.

### 3.3 Liberación in vitro de encefalinas

La utilización de rebanadas del tejido cerebral en la electrofisiología y neuroquímica ha crecido substancialmente desde 1975 a la fecha. Los trabajos iniciales, con porciones aisladas de cerebro, datan de 1939. Libet y Gerard (75), estudiaron en el cerebro de la rana los potenciales espontáneos. Este tipo de preparación, en un principio se limitó a los efectos metabólicos (83) y biofísicos de la membrana neuronal (36,84).

Los registros de la actividad eléctrica en rebanadas cerebrales fueron reportadas por primera vez en 1966 por Yamamoto

y McIlwain (137), quienes al aislar rebanadas de la corteza prepiriforme encontraron que la actividad eléctrica se podía mantener en forma semejante tanto en la preparación in vitro como en la preparación intacta.

Aunque el hipocampo, por su estructura laminar, es ideal para su estudio en rebanadas, (127), otras estructuras como el hipotálamo (98), tálamo (46), espina dorsal (63), y cerebelo (88,136) se han utilizado para analizar la actividad espontánea y evocada de la actividad eléctrica neuronal. Al iniciar la década de los 80's, el uso de rebanadas cerebrales se había extendido a prácticamente a todas las regiones del cerebro, tanto de vertebrados como de invertebrados (77).

El estudio de la neurobiología del SNC, encuentra en la preparación de rebanadas in vitro varias ventajas, entre ellas:

- a. La composición química del medio de incubación puede ser específico y mantenido constante durante más de 4 horas o también puede ser modificado en ese mismo lapso.
- b. Factores como el pH y temperatura pueden ser alterados.
- c. La preparación mantiene, su actividad eléctrica, anabólica y catabólica en condiciones semejantes al animal intacto.
- d. No se requiere de anestésicos o agentes extraños para la preparación de la muestra.
- e. Para la electrofisiología, permite una observación visual, para la inserción de electrodos u otras manipulaciones del tejido.

f. Por el grosor de la rebanada, se mantienen muchos circuitos neuronales intactos.

Como cualquier otra técnica, también tiene sus limitaciones y factores que pueden alterar las propiedades de las rebanadas, entre las más comunes se encuentran: modificaciones en el pH y temperatura, tipo y volumen de la cámara de perfusión, tiempo desde el sacrificio del animal hasta que la rebanada entra en contacto con el amortiguador. Este tiempo es un factor muy importante que debe ser promediado y evaluado en cada laboratorio, una vez que las rebanadas son sumergidas en el amortiguador su actividad se podrá mantener por varias horas. Debe ser considerado el grosor de la rebanada, las cuales como una gran desventaja contiene a las células gliales.

En el balance de sus ventajas y desventajas la preparación de rebanadas e inclusive de sinaptosomas, permite abordar problemas de índole bioquímico, farmacológico, neuroquímico y electrofisiológico.

En el presente trabajo, en los experimentos de liberación in vitro se utilizaron los animales sometidos al etanol en forma crónica al 20 % y aguda sacrificados a los 20 y 80 min después de la inyección. El cuerpo estriado de estas ratas fue disectado rápidamente y colocados en grupos de 3 estriados cada uno, se rebanaron en 2 direcciones a 90 y a intervalos de 30 micras con un rebanador de tejido (Brinkman Tissue Choper). Las rebanadas

resultantes se incubaron durante 15 min en 25 ml de amortiguador Krebs-bicarbonato a 37 C saturado con una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95/5%. La composición del medio Krebs-bicarbonato fue (mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, Glucosa 10. Las rebanadas fueron perfundidas con el medio Krebs-bicarbonato oxigenado, con un flujo de 1 ml/min. Después de un lavado preliminar de 15 min, las rebanadas fueron perfundidas durante 20 minutos., en seguida se perfundieron con un medio de alta concentración de potasio (22 mM). Los experimentos se realizaron simultáneamente con 4 cámaras de perfusión en las mismas condiciones (3 estructuras en cada una, 2 cámaras con tejido control y 2 con tejido experimental). Los experimentos de liberación de ME en animales tratados en forma crónica y aguda con etanol, se llevaron a cabo en presencia del dipéptido phe-ala a una concentración 1 mM, el cual ha mostrado inhibir la acción de la encefalinasa (100,141). En cada uno de los experimentos, tanto las rebanadas perfundidas como los perfusados se hirvieron en 10 vol de HCl 0.1 N durante 15 min para inactivar a las enzimas digestivas aún activas en presencia del inhibidor y se congelaron a -20 C. hasta la posterior cuantificación de encefalinas.

#### **3.4. Cuantificación de Etanol en sangre**

Después de la decapitación se recolectó la sangre del tronco del la rata, se obtuvo el suero por centrifugación a 3,000 rpm



durante 10 min a temperatura ambiente. Se utilizó un método enzimático para conocer la concentración de etanol en sangre el cual puede evaluar la conversión de NAD hacia NADH por medio de la deshidrogenasa alcohólica (ADH). La cantidad de NADH es proporcional a la concentración de etanol en sangre y se determina espectrofotométricamente a 340 nm (Fig.1).

Se presenta un resumen del método para la calibración de la curva patrón:

1. Preparar una solución patrón de etanol diluido, mezclando 0.5 ml de la solución de etanol más 2.0 ml de amortiguador con glicina.
2. El frasco que contiene NAD-ADH, se resuspende en el amortiguador con glicina, sin agitación.
3. A continuación se enumeran 5 tubos de ensayo y se añaden en orden los siguientes volúmenes:

1	2	3	4	5
Tubo	Solución NAD-ADH (ml)	Etanol diluido (ml)	Registro de Absorbencia	Contenido de etanol % (p/v)
1	3.00	0.00	Referencia	0.00
2	2.95	0.05		0.08
3	2.90	0.10		0.16
4	2.85	0.15		0.24
5	2.80	0.20		0.32

4. Los tubos de ensayo se cubren con tapón de goma, para impedir la evaporación del etanol. Se incubó durante 10-15 min a temperatura ambiente.
5. Medir la absorbencia en un espectrofotómetro a 340 nm.
6. Graficar los valores de la absorbencia columna 4 vs. la columna 5.

### 3.5 Disección de las Estructuras Cerebrales

El cuerpo estriado, hipocampo e hipotálamo fueron disectados de acuerdo a los parámetros descritos por Glowinsky e Iversen (39) con algunas modificaciones:

1. Un primer corte transverso fue realizado justo posterior a la corteza olfatoria. A 6670 micras de acuerdo al Atlas de Koning y Klippel (67).
2. El corte del hipotálamo lateral fue realizado a una distancia de 2 mm a partir de la línea media. La disección de la amígdala se realizó de acuerdo al procedimiento de Engel y col. (31).

### 3.6 Cuantificación de Encefalinas

El tejido fue pesado e incubado en 6 vol. de HCl 0.1 N a 95 C durante 15 min, enfriado en baño de hielo, homogeneizado y centrifugado a 50.000 x g a 4 C, durante 60 min. El sobrenadante fue purificado mediante cromatografía de adsorción en columnas

con Amberlita XAD-2 con un flujo de 0.5 ml/min. El contenido de encefalinas se cuantificó por la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Las muestras fueron procesadas por triplicado utilizando anticuerpos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (132). El antisuero de Leu-encefalina mostró reactividad cruzada del 5.9% con Met-encefalina y del 1.4 % con dinorfina 1-13. No se detectó reactividad cruzada con alfa, gamma y beta-endorfina. El antisuero de Met-encefalina mostró un cruzamiento del 100 % con Met-(o)-encefalina, 0.3% con Leu-encefalina, 0.2% con el heptapéptido ME-arg-phe y menos del 0.01 % con ME-arg, dinorfina 1-13, octapéptido ME-arg-gly-leu, alfa, gamma y beta-endorfina. La dilución de de las curvas provenientes de los extractos de tejido fueron paralelas con las obtenidas con encefalinas sintéticas, el contenido de cada encefalina se expresa como mol de inmunorreactividad (IR-encefalina/g de peso húmedo). Las curvas patrón para cada péptido se muestran en las Figuras 2 y 3.

La producción de antisueros contra encefalinas se obtuvo después de la inmunización de conejos Nueva Zelanda con péptidos unidos a la Albúmina Sérica Bovina (ASB), por medio de glutaraldehído. El conjugado fue preparado al disolver 5 mg del pentapéptido con 1 mg de de ASB en 200 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4., posteriormente se añadieron 10 microlitros de glutaraldehído al 5 % y 3-H-met-encefalina (25,000 cpm), como indicador de la cantidad del

péptido unido a la ASB. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla fue separada cromatográficamente en una columna con Sephadex G-25, la muestra se eluye con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y el pico correspondiente al indicador radioactivo encefalina-ASB recuperado. El material es emulsificado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund y un mililitro fue utilizado para inmunizar a los conejos con inyecciones subcutáneas. El proceso de inmunización fue repetido una vez después de 4 semanas. La obtención de sangre de la oreja del animal se realizó después de 2 semanas, para comenzar con las pruebas de los títulos de los antisueros. El antisuero diluido (anti-met-encefalina 1:500; anti-leu-encefalina 1:850) se incubaron con 0.5 pmol de 3-H-encefalina y con soluciones patrón de encefalinas no radioactivas o muestras de tejido incubadas en 500 microlitros de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (conteniendo 0.1 % de gelatina, 0.01 % de azida de sodio, 0.1 % de ASB y 0.9 % de NaCl). Después de la incubación durante 24 horas. a 4 C , la encefalina radioactiva unida al antisuero, es separada del radioactivo libre con 200 microlitros de una solución de carbón activado al 1.5 % y 0.15 % de dextran en agitación constante.

#### IV. RESULTADOS

La tabla 1 muestra la variación del peso corporal y la

cantidad en gramos de etanol ingerido por las ratas durante el alcoholismo crónico. Los animales control aumentaron de peso durante los 45 días del experimento, la contraparte experimental mantuvo su peso corporal durante el mismo tiempo. La cantidad de etanol ingerido por las ratas fue en aumento conforme se incrementó la dosis de etanol. El aumento fue significativo de acuerdo a la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA).

Al término del experimento crónico Tabla 2, la cantidad de encefalinas en todas las estructuras analizadas es significativamente menor con relación a su control, excepto en el hipocampo en donde la LE no presenta cambios. La cantidad promedio de etanol en sangre en el momento del sacrificio fue de  $81 \pm 10$  mg/dl. A un grupo de ratas se les retiró el etanol y su medición en suero se realizó 24 horas después, a este tiempo el etanol, con el método enzimático utilizado, ya no es detectado. La concentración de encefalinas fue similar al control.

Las tablas 3 y 4 muestran los cambios producidos por la administración de etanol en forma aguda, a una dosis de 3 g/kg por vía intraperitoneal (i.p.), sobre la concentración de encefalinas a diferentes tiempos. A los 10 minutos las ratas han perdido el equilibrio pero todavía están concientes. Entre los 20 y 40 minutos posteriores a la inyección presentan atonía muscular y pérdida de la conciencia. A los 80 minutos, todos los animales han recobrado la conciencia y parcialmente el equilibrio.

El etanol reduce la cantidad de ME en la amígdala y el cuerpo estriado a los 10 y 20 minutos respectivamente y regresa a valores similares al control a los 80 minutos. En el hipocampo el contenido de ME desciende desde los primeros 10 minutos, pero no recupera como en el caso de amígdala y cuerpo estriado, el valor control aún después de transcurridos 80 minutos. La ME en el hipotálamo no presenta cambios (Tabla 3).

El otro pentapéptido la LE, disminuye su concentración en forma significativa en la amígdala, cuerpo estriado e hipotálamo, antes de transcurrir 10 minutos, sin embargo en el hipocampo su concentración no se modifica.

La tabla 5 muestra a tiempos más cortos los efectos del etanol, administrado en forma aguda. Como se observa, existe una disminución significativa de ME a los 2 minutos con respecto al control, sin embargo se manifiesta un incremento también significativo a los 5 minutos, es decir 3 minutos después de la reducción con respecto al control, a los 10 y 15 minutos la concentración de ME en el cuerpo estriado disminuye nuevamente en forma significativa con respecto al control.

Los resultados anteriores muestran un rasgo general; el etanol disminuye temporalmente la concentración tisular de encefalinas, tanto en el modelo crónico como en el agudo, los valores de encefalinas retornan a un valor semejante al control aproximadamente 80 minutos después de la inyección con etanol.

La reducción significativa de encefalinas en el tejido cerebral durante el paradigma crónico, puede tener dos explicaciones: por un lado la reducción de la síntesis de proteínas, por otro, un incremento de su liberación. La reducción de la concentración de los pentapéptidos durante el modelo agudo, que no interfiere con la síntesis de proteínas, puede deberse a un incremento en su liberación.

El presente trabajo estudia la última instancia, es decir el análisis de la liberación *in vitro* de ME a partir de rebanadas del cuerpo estriado.

Las Figuras 4 y 5 corresponden a los controles previos a los experimentos de liberación, en todos los casos se registran 3 valores medidos en el tiempo: liberación basal, cantidad de encefalina que se libera en forma espontánea en el amortiguador (25-35 min), liberación evocada de encefalina en presencia de una concentración alta de potasio (35-45 min), liberación de encefalina posterior a la estimulación con potasio (45-55 min) la cual permite conocer si el efecto producido por la presencia de potasio durante 10 min ha terminado, la liberación debe entonces tener una tendencia a el valor basal.

Los primeros 25 minutos en cada experimento es el tiempo de lavado y preparación de las rebanadas antes de coleccionar su valor basal ya en el equilibrio dentro de las cámaras. La figura 4 muestra el efecto en presencia y ausencia de calcio, catión

divalente, cuya presencia es indispensable para la liberación de un neurotransmisor de la terminal sináptica. La figura 5 muestra la recuperación de encefalinas en ausencia y en presencia del inhibidor de la encefalinasa, el dipéptido phe-ala.

En el experimento crónico, la liberación in vitro de ME a partir de rebanadas de cuerpo estriado, es similar con respecto a su control (Figura 6). Durante la exposición aguda con etanol, se observa un dato inverso al esperado, es decir, mientras que en el tejido la menor cantidad de ME se presenta a los 20 minutos (tabla 3), su liberación no cambia con respecto al control (fig 7). La liberación tampoco se modifica después de transcurridos 80 minutos. (fig 8).

Los cambios significativos en la liberación evocada de ME, se realizan a los 2 y 5 minutos posteriores al estímulo con etanol, cuando se analizó la liberación a los 10 y 15 minutos, la liberación control fue mayor a la experimental (figuras 9 y 10).

#### IV. DISCUSION

El presente trabajo demuestra claramente la alteración del etanol tanto en forma aguda como crónica sobre la concentración de encefalinas en casi todas las estructuras analizadas, así como en la liberación in vitro de met-encefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado.

Los animales que ingirieron etanol, conservaron su peso



corporal durante los 45 días que fueron sometidos al etanol como única fuente de líquidos ( el etanol se administró a dosis del 5 al 20 % durante 15 días en cada una de ellas), en contra parte los animales control, aumentaron su peso corporal en forma significativa en el mismo lapso de tiempo (tabla 1). El efecto es consistente con lo reportado por Bitsh y col. (9) quienes mencionan que el consumo prolongado del etanol induce a una deficiencia de tiamina a pesar de ser suministrada en la dieta.

El tratamiento con etanol en forma crónica, a dosis de 5,10, y 20 % (v/v), como única fuente de líquidos y con 15 días de duración en cada una de ellas, disminuye en forma significativa la concentración de encefalinas en todas las estructuras analizadas excepto en el hipocampo en donde el contenido de LE no se modifica. Esta reducción puede ser consecuencia de la interferencia del etanol con la síntesis proteínica, ya sea a nivel de la incorporación de aminoácidos (93), o con la inhibición de la aminoacil-ARNt-sintetasa (94), los autores encuentran que la inhibición es progresiva a medida que aumenta la concentración de etanol y el tiempo de exposición. Efectos de esta naturaleza han sido señalados para proteínas del sistema opioide. En el lóbulo intermedio de la hipófisis de rata, la incorporación de 3-H-phe a la síntesis de beta-endorfina se reduce un 30 % cuando los animales son expuestos al etanol en forma crónica (115,116). La proteína alfa-MSH, también reduce su

contenido después de la exposición crónica al etanol (106). Los cambios se revierten cuando se suspende la ingesta de etanol. Estos datos son consistentes con los señalados por Schulz y col. (114). Los autores encuentran disminuidos los valores de ME en el cuerpo estriado y cerebro medio de la rata, sin embargo, reportan la recuperación total de ME 6 días después. Es probable que la diferencia en el tiempo se deba a que su medición se realizó hasta los 6 días de retirado el etanol. La velocidad de conversión del etanol en acetaldehído se realiza en término de horas y no de días (20). La disminución de LE y ME en el estriado, estructura involucrada en los mecanismos de control de locomoción en respuesta al tratamiento en forma crónica, puede estar mediada por la estimulación del etanol sobre el sistema dopaminérgico en la actividad nigroestriatal, ya que la dopamina inhibe tónicamente la síntesis y liberación de ambos péptidos (10,13,43,62,115,133).

Es importante señalar que la presencia del etanol no produce cambios en el contenido de LE en el hipocampo. Esta estructura es rica en precursores derivados de la Prodinorfina (1), por consiguiente el mecanismo biosintético puede diferir con el procesamiento de la Proencefalina A. Varios autores han reportado que el etanol, en el hipocampo produce pérdida del número de células piramidales (55,71,134). Lescuaron y col. demostraron que el etanol, administrado crónicamente por vía oral por espacio de 9

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

meses, reduce el número de dendritas en el hipocampo significativamente. Las mediciones realizadas antes de un mes no presentaron cambios (70). Es posible que las alteraciones morfológicas, neuroquímicas que pueden incluir a los péptidos opioides, sólo se manifiesten después de la exposición prolongada al etanol.

La administración de etanol en forma aguda disminuye la concentración de encefalinas en forma inmediata, la respuesta es diferente en función de la estructura y tiempo analizado. En los primeros 10 minutos posteriores a la inyección de etanol, la LE reduce su concentración de manera significativa en el cuerpo estriado, amígdala e hipotálamo, en el hipocampo no se presentan cambios.

Al mismo tiempo, la cantidad de ME se reduce significativamente en la amígdala e hipocampo. El efecto en el cuerpo estriado, tiene variantes importantes, a los 2 minutos se reduce el contenido en forma significativa, para aumentar dramáticamente en los siguientes 3 minutos, es decir cuando la medición tisular se realizó a los 5 minutos la concentración es significativamente mayor con respecto a los 2 minutos. A los 10 y 15 minutos la disminución continua hasta los 20 minutos. Mediciones posteriores señalan que el tejido comienza a recuperar el contenido de encefalina semejante al control. En el hipotálamo el contenido de ME no se modifica. Sin embargo,

en función del tiempo y a medida que la cantidad de etanol circulante disminuye, las diferentes cantidades de encefalinas en las estructuras afectadas retornan a un valor semejante al control, aproximadamente a los 80 minutos después del estímulo con etanol.

Es probable que algunos efectos causados por el etanol sean debidos al producto de su degradación, el acetaldehído, molécula inclusive más tóxica que el etanol (20,30). El acetaldehído tiene una alto grado de tolerancia cruzada con el etanol, propiedad que incrementa el efecto del etanol (96). Moléculas como el pirazol inhibidor de la deshidrogenasa alcohólica, potencia los efectos agudos y crónicos del etanol (96). La cantidad de encefalina que se recupera en un tiempo tan corto, puede ser consecuencia de su recambio a partir de precursores putativos encefalinérgicos de bajo peso molecular, presentes en la terminal sináptica, como el heptapéptido ME-arg-phe, y el octapéptido ME-arg-phe-gly, moléculas ampliamente distribuidas en el SNC (111,135,138,139,140), éstos péptidos por acción de enzimas del tipo de la tripsina y carboxipeptidasa B, al remover a los aminoácidos de la porción carboxilo terminal (7,138), pueden dar lugar, en experimentos *in vitro* a la molécula de ME. Por otra parte se ha reportado la co-existencia de péptidos derivados de la prodinorfina (65), como la dinorfina 1-9, en cuya secuencia se encuentra una copia de LE y que puede ser

generada en forma libre (86), o presentarse protegida para evitar su degradación (131).

Los experimentos de liberación de ME en el modelo crónico, no muestran cambios con respecto a su control, este resultado puede ser debido a que el etanol altera la síntesis de proteínas y no el mecanismo de liberación (93).

En el modelo agudo, los datos de la tabla 3, muestran un descenso significativo de ME en el cuerpo estriado a los 20 minutos y una recuperación a los 80 minutos posteriores a la inyección de etanol. Las cantidades liberadas en ambos tiempos son similares al control. Una posible explicación es que el efecto del etanol, es inmediato, su paso a través de la barrera hematoencefálica alcanza las membranas neuronales en segundos (13,26). Así las mediciones a los 20 y 80 minutos pueden resultar posteriores al efecto causado por el etanol en las membranas y por lo tanto la liberación en esos momentos sea similar al control.

Cuando medimos la liberación a un tiempo más corto después de la inyección con etanol, es decir a los 2 y 5 minutos (ya se observan cambios conductuales), encontramos un incremento significativo en la liberación de ME con respecto a su control. Otros autores han encontrado que la liberación de beta-endorfina del lóbulo anterior de la hipófisis se incrementa después del tratamiento con etanol. Este fármaco estimula la liberación del

Factor Liberador de la Corticotropina (CRF) de las neuronas hipotalámicas y aumenta la liberación y síntesis de ACTH, beta-LPH, y beta-endorfina (35).

El rápido efecto del etanol en la liberación de ME, puede deberse a un mecanismo mediado en la membrana citoplásmica y no a la interferencia del etanol en la síntesis de proteínas. Los datos de Jefferys y col. (57) son consistentes con nuestros resultados, los autores sugieren que las encefalinas se liberan en grandes concentraciones durante el coma inducido por el etanol, cuando se ha ingerido en cantidades tóxicas. Un elevado porcentaje de pacientes tratados con naloxona pueden salir del coma producido por el etanol. Los datos del presente trabajo muestran un fenómeno interesante en el cuerpo estriado, por un lado existe una reducción significativa de encefalina en el tejido a los 2 minutos (tabla 5), contra un incremento de su liberación al mismo tiempo (figura 9), el tejido recupera, en los siguientes 3 minutos una cantidad muy grande de encefalina, a los 5 minutos existe casi el doble de ME en el tejido, esta diferencia puede provenir de los precursores putativos de bajo peso molecular como el hepta y octapéptido, presentes en la terminal sináptica. La liberación de ME a los 5 minutos se mantiene elevada con respecto al control, presumiblemente la neurona estriatal realiza un recambio muy rápido hacia ME, al tiempo que mantiene elevada su liberación. A los 10 y 15 minutos la concentración y

liberación tienen valores menores a sus respectivos controles. A los 20 minutos la liberación es similar al control, no así su concentración que permanece abatida, para finalmente recuperarse después de 80 minutos.

Es necesario señalar que el efecto del etanol, es muy rápido, si bien las mediciones de la liberación se realizan 25 minutos después de sacrificado el animal y el etanol ya no está presente en la preparación, al ser eliminado por los lavados que sufre el tejido con el amortiguador, la preparación in vitro mantiene el efecto del momento del sacrificio, por ello es muy importante llevar rápidamente las rebanadas al amortiguador, para mantener el estado funcional de las neuronas en la medida que el mismo método lo permite. Teyler y col. (127) señalan que en la liberación "in vitro", sólo se recupera entre un 4 a 6 % de la cantidad total del compuesto presente en el tejido. En nuestras mediciones ocurre lo mismo, si evaluamos la cantidad de encefalina presente en el tejido, la cantidad recuperada no alcanza el 5 % del total. Sin embargo aún tomando en cuenta esta restricción, el estado funcional anormal de las células por efecto del etanol se puede evaluar en la preparación in vitro.

El posible mecanismo de acción en membrana, puede ser muy rápido y selectivo. El etanol actúa preferencialmente sobre determinadas áreas de la membrana con un alto grado de selectividad. Esta selectividad puede ser el resultado de la

heterogeneidad de la membrana (diferente composición de lípidos) y de las características de la membrana en diferentes células u organelos. Existe un tipo de proteínas unidas a membrana que de acuerdo a la estructura en donde se encuentren son muy sensibles a bajas concentraciones de etanol. Uno de los mejores ejemplos estudiados es la enzima adenilato-ciclase (78). Esta enzima está vinculada a la función de varios neurotransmisores en el SNC y juega un papel clave en la transmisión sináptica. El etanol aumenta la actividad de la adenilato-ciclase cerebral y en presencia de nucleótidos de guanina, concentraciones muy bajas de etanol, incrementa la actividad de la enzima (78). Sin embargo, existe una diferencia importante, que puede explicar la respuesta del etanol a nivel de la membrana de diferentes estructuras. La actividad de la enzima se altera en función de la estructura en la cual este integrada.

El complejo dopamina-receptor-adenilato-ciclase en el cuerpo estriado, presenta un solo sitio de acción para el etanol, al interferir con la proteína G y la unidad catalítica (105). El mismo complejo para la norepinefrina en la corteza cerebral presenta múltiples sitios de acción (104).

La interacción del etanol con los receptores opiáceos es otro ejemplo de especificidad. Existe un gran número de subtipos de receptores opiáceos con diferente afinidad por su ligando endógeno. Los receptores delta, tienen mayor afinidad por la LE y



es particularmente sensible al etanol, el etanol disminuye la afinidad del ligando por el receptor (66). sin embargo, el receptor kappa es muy resistente al efecto del etanol (103). La distribución de ambos receptores es diferente, los receptores delta, se encuentran ampliamente distribuidos en estructuras como amígdala, estriado, hipocampo y septum. Los receptores kappa, se ubican en sustancia gris periacueductal y tallo cerebral (1).

La especificidad de respuestas al etanol sugiere que si bien no se han identificado receptores específicos para el etanol en el SNC como los hay para otras drogas psicotrópicas, el etanol puede actuar de manera selectiva con una región particular de proteínas en la membrana neuronal y ejercer sus manifestaciones fisiopatológicas.

## REFERENCIAS

1. AKIL H, WATSON S J, YOUNG E, LEWIS M E, KHACHATURIAN H, WALKER J M: Endogenous Opioids: Biology and Function. *Ann.Rev. Neurosci.* 7: 223-255, 1984.
2. ANDREWS T M, TATA J R: Protein synthesis by membrane-bound and free ribosomes of secretory and non-secretory tissues. *Biochem.J* 121: 683-689, 1971.
3. BAGHAT B, RANA W, HUGHES M J: Alcohol and nicotine and brain catecholamines. *Federation Proc.* 29: 546-549, 1970.
4. BARDO M T, BHATNAGAR R, GEBHART G: Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res.* 289: 223-234, 1983.
5. BAYON A, ROSSIER J, MAUSS A, BLOOM F E, IVERSEN L, LING N, GUILLEMIN R: In vitro release of 5-methionine-enkephalin and 5-leu-enkephalin from the rat globus pallidus. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 75: 3503-3506, 1978.
6. BAYON A, SHOEMAKER W J, LUGO L, AZAD R, LING N, DRUKER-COLIN R, BLOOM F: In vivo release of enkephalin from the globus pallidus. *Neurosci.Lett.* 24: 65-72, 1981.
7. BENUCK M, BERG M J, MARKS N: Met-enkephalin-arg-phe metabolism: conversion to met-enkephalin by brain and kidney dipeptidyl carboxipeptidases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 99: 630-636, 1981.
8. BHARGAVA H N, RAPAKA R S: Effect of ethanol on the binding of conformationally rigid and labile ligands of opioid receptors to rat brain membranes. *Biochem.Pharmacology* 37: 2279-2283, 1987.
9. BITSH R, HANSEN J, HOTZEL D: Thiamine metabolism during long-term alcohol administration. Ethanol induced changes at suboptimal thiamine supply. *J.Int.Vitam.Nutr.* 52: 253-259, 1982.
10. BLUM K, BRIGGS A H, ELSTON S F A, DELALLO L, SHERIDAN P J: Reduced leucine-enkephalin-like immunoreactive substance in hamster basal ganglia after long-term ethanol exposure. *Science* 216: 1425-1426, 1982.
11. BLUME A: Opiate binding to membrane preparations of neuroblastoma cells NG108-15 effects of ions and nucleotides. *Life Sci.* 22: 1843-1850, 1978.
12. BLUME A: Interaction of ligands with the opiate receptors: regulation by ions and nucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 72: 590-596, 1978.

13. BLUMM K, HAMILTON M G, WALLACE J E: Alcohol and Opiates: A review of common neurochemical and behavioural mechanisms. En: K Blumm (Ed). Alcohol and Opiates. Raven Press, N.Y., 203-233, 1977.
14. BONNET K A, GROTTIN J, GIOAMNINI T, CORTES M, SIMON E J: Opiate receptors heterogeneity in human brain regions. Brain Res. 221: 437-440, 1981.
15. BOURGOIN S, CASSELIN F, ARTAUD F, GLOWINSKY J, HAMON H: In vivo modulations by GABA-related drugs of met-enkephalin release in basal ganglia of the cat brain. Brain Res. 248: 321-330, 1982.
16. BRADBURY A F, FELDBERG W F, SMITH D G, SNELL C: Lipoprotein C-fragment: An endogenous peptide with potent analgesic activity. En: H Kosterlitz (Ed). Opiates and Endogenous Opioid Peptides. Elsevier, Amsterdam, 63-70, 1976.
17. CARLSSON A, LINDQUIST A: Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. J.Pharm. Pharmacol. 25: 437-440, 1973.
18. CARLSSON A, MAGNUSSON T, SVENSSON T H, WALDECK B: Effect of ethanol on the metabolism of brain catecholamines. Psychopharmacologia. 30: 27-32, 1973.
19. CASSELIN F, SOURBRIE P, BOURGOIN S: In vivo release of met-enkephalin in the cat brain. Neuroscience. 6: 301-313, 1981.
20. CAVEY C V: Alcoholism- A Biological Approach. Trends in Neurosci. 2: 23-25, 1979.
21. CHANG K J, BRANCHARD S, CUATRECASAS P: Unmasking of magnesium-dependent high-affinity binding sites for (D-ala-2,D-Leu-5)-enkephalin after pretreatment of brain membranes with guanine nucleotides. Proc.Natl.Acad.Sci. 80: 940-944, 1983.
22. CHANG K J, CUATRECASAS P: Multiple opiate receptors: enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. J.Biol. Chem. 254: 2610-2618, 1979.
23. CHANG K J, HAZUM E, CUATRECASAS P: Novel opiate binding sites for benzomorphan drugs. Proc.Natl.Acad.Sci. 78: 4141-4145, 1981.
24. CHIN J H, GOLDSTEIN D: Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol. Science. 196: 684-685, 1976.
25. CHIN J H, GOLDSTEIN D: Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. Mol.Pharmacol. 13: 425-431, 1977.

26. CHIN J H, GOLDSTEIN D: Membrane-disordering action of ethanol variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. *Mol. Pharmacol.* 19: 425-431, 1981.
27. CORRODI H, FUXE K, HOKFELT T: The effect of ethanol on the activity of central catecholamine neurons in rat brain. *J.Pharm. Pharmacol.* 18: 821-825, 1966.
28. DEL CASTILLO J, KATZ B: Quantal components of the end-plate potential. *J.Physiol (London)*. 124: 560-573, 1954 a.
29. DURITZ G, TRUITT B: Importance of acetaldehyde in the action of ethanol on brain norepinephrine and 5-hydroxytryptamine. *Biochem. Pharmacol.* 15: 711-716, 1966.
30. ELLINGBOE J: Effects of alcohol on neurochemical processes. En: A M Lipton, K F DiMascio (Eds). *Psychopharmacology: A Generation of Progress*. Raven Press., N.Y., 1653-1664, 1978.
31. ENGEL J, SHARPLESS N S: Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Res.* 136: 381-386, 1977.
32. FARIAS R N, BLOJ B, MORERO R D, SENERIZ F, TRUCCO R E: Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrane lipid composition. *Biochem.Biophys.Acta.* 415: 231-251, 1975.
33. FATT P, KATZ B: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J.Physiol. (London)* 117: 109-128, 1952.
34. FLEMING E W, TEWARI S, NOBLE E P: Effects of chronic ethanol ingestion on brain aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA. *J. Neurochem.* 24: 553-560, 1975.
35. GIANULAKIS C, BARCOM A: Effect of acute ethanol in vivo and in vitro on the b-endorphin system in the rat brain. *Life Sci.* 40: 19-28, 1987.
36. GIBSON I, McILWAIN H: Continuous recording of changes in membrane potential in mammalian cerebral tissues in vitro: recovery after depolarization by added substances. *J.Physiol (London)* 176: 261-283, 1965.
37. GILBERT P, MARTIN W: The effects of morphine and nalorphine like drugs in the nondependent, morphine dependent and cyclazocine dependent chronic spinal dog. *Exp.Neurol.* 198: 66-82, 1976.
38. GLOWINSY J, IVERSEN L L: Regional studies of catecholamines in rat brain. *J.Neurochem.* 13: 655-669, 1966.

39. GOLDSTEIN D: Relationship of alcohol dose to intensity of withdrawal signs in mice. *J.Pharm.Exp.Ther.* 180: 203-215, 1972.
40. GOLDSTEIN D: Alcohol withdrawal reactions in mice: effects of drugs that modify neurotransmission. *J.Pharm.Exp.Ther.* 186: 1-9, 1973.
41. GOLDSTEIN D: Inherited differences in intensity of alcohol withdrawal reactions in mice. *Nature.* 245: 154-156, 1973.
42. GOLDSTEIN D, CHIN J H: Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed.Proc.* 40: 2073-2076, 1981.
43. GRIFFITHS P J, LITTLETON J M, ORTIZ A: Changes in monoamine concentrations in mouse brain associated with ethanol dependence and withdrawal. *Brit.J.Pharmacol.* 51: 307-309, 1974.
44. HARRIS R A, GROH G I, BAXTER D M, HITZEMANN R J: Gangliosides enhance the membrane actions of ethanol and pentobarbital. *Mol. Pharmacol.* 25: 410-417, 1984.
45. HARRIS R A, SCHROEDER F: Ethanol and the physical properties of brain membranes: fluorescence studies. *Mol. Pharmacol.* 20: 128-137, 1981.
46. HATTON G, DORAN A, SALM A, TWEEDLE C: Brain slice preparation: hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 5: 405-414, 1980.
47. HENDERSON G, HUGHES J, KOSTERLITZ H: In vitro release of leu- and met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature.* 262: 782-783, 1978.
48. HILLER J M, ANGEL L M, SIMON E J: Multiple opiate receptors: alcohol selectively inhibits binding to delta receptors. *J. Neurochem.* 43: 1003-1010, 1981.
49. HOLT V, PRZEWLOCKI R, HERZ A: Beta-endorphin like immunoreactivity in plasma, pituitary and hypothalamus of rats following treatment with opiates. *Life Sci.* 23: 1057-1066, 1978.
50. HUGHES J: Isolation on an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88: 295-306, 1975.
51. HUGHES J, SIMITH T, KOSTERLITZ H, FOTHERGILL L, MORGAN B, MORRIS H: Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agnoist activity. *Nature.* 255: 577-579, 1975.
52. HUNT W A, MAJCHROWICZ E: Alterations in the turnover of brain norepinephrine and dopamine in alcohol-dependent rats. *J. Neurochem.* 23: 549-551, 1974.

53. HUNT W A, MAJCHROWICZ E: Alterations in the turnover of brain norepinephrine and dopamine in alcohol-dependent rats. *J. Neurochem.* 23: 549-553, 1974.
54. HYNES M D, LOCHNER M A, BEMIS K G, HYMSON D L: Chronic ethanol alters the receptor binding characteristics of the delta opioid receptor ligand, D-Ala-2-D-Leu-5 enkephalin, in mouse brain. *Life Sci.* 21: 2331-2337, 1983.
55. IRLE E, MARKOWITSCH H J: Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin-B1 (thiamin) deficiency in rats. *Exp. Brain Res.* 9: 277-294, 1983.
56. IVERSEN L, IVERSEN S D, BLOOM F, VARGO T, GUILLEMIN R: Release of enkephalin from rat globus pallidus in vitro. *Nature.* 271: 679-681, 1978.
57. JEFFERYS D B, FLANAGAN R S, VALANS G N: . *Lancet.* 1: 308-309, 1980.
58. JOHNSON D A, LEE N M, COOKE R, LOH H H: Ethanol-induce fluidization of brain lipid bilayers: required presence of cholesterol in membranes for the expression of tolerance. *Mol. Pharmacol.* 15: 739-746, 1979.
59. KAKIDANI H, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine b-neoendorphin/ dynorphin precursor. *Nature.* 298: 245-251, 1982.
60. KALANT H: Alcohol and Derivates. En: J Tremoliers (Ed). *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.* Pergamon., Oxford, 1970.
61. KALANT H: Direct effects of ethanol on the nervous system. *Fed. Proc.* 34: 1930-1941, 1975.
62. KAROUN F, WYATT R J, MAJCHROWICZ E: Brain concentrations of biogenic amine metabolites in acutely treated and ethanol-dependent rats. *Brit. J. Pharmacol.* 56: 403-411, 1976.
63. KATO H: Types of neurons in the slices LGB of cat. *Brain Res.* 66: 332-336, 1974.
64. KATZ B: *Nerve, Muscle, and Synapse.* McGrae-Hill, 1966. 129-141.
65. KHACHATURIAN H, LEWIS M E, WATSON S J: Colocalization of proenkephalin peptides in rat brain neurons. *Brain Res.* 279: 369-373, 1983.
66. KHATANI S, PAULAL, HOFFMAN T, SHIBUYA T, SALAFSKY B: Selective effects of ethanol on opiate subtypes in brain. *Neuropharmacol.* 26: 1503-1508, 1987.

67. KONING J F R, KLIPPEL R A: The rat brain: A stereotaxic Atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams and Wilkins., Baltimore, 1963.
68. KOSTERLITZ H: Mechanisms of pain and analgesic compounds. Raven Press., N.Y., 1979.
69. LAW P, HOM D, LOH H: Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. Mol.Pharmacol. 22: 1-4, 1982.
70. LESCAUDRON L, JAFFARD R, VERNA A: Modifications in number and morphology of dendritic spines resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal: A Golgi study in the mouse anterior and posterior hippocampus. Exp.Neurol. 106: 156-163, 1989.
71. LESCAUDRON L, VERNA A: Effects of chronic ethanol consumption on pyramidal neurons of the mouse dorsal and ventral hippocampus: A quantitative histological analysis. Exp.Brain Res. 58: 362-367, 1985.
72. LEWIS M E, KHACHATURIAN H, WATSON S J: Visualization of opiate receptors and opioid peptides in sequential brain sections. Life Sci. 31: 1247-1250, 1982.
73. LEWIS R V, STERN A S, KIMURA S, ROSSIER J, STEIN S, UDENFRIEND S: A 50,000 Daltons protein in adrenal medulla that may be a common precursor of met- and leu-enkephalin. Science. 298: 1459-1462, 1980.
74. LI C H, BARNAFI L, CHRETIEN M, CHUNG D: Isolation and amino acid sequence of beta-LPH from sheep pituitary glands. Nature. 206: 577-580, 1965.
75. LIBET B, GERARD R W: Control of potential rhythm of isolated frog brain. J. Neurophysiol. 2: 153-169, 1939.
76. LINDBERG L, DAHL L: Characterization of enkephalin release from rat striatum. J.Neurochemistry. 36: 506-512, 1981.
77. LIPTON P: Brain Slices. En: (Ed). Neuromethods: General Neurochemical Techniques. Humana Press., New Jersey, 80-83, 1986.
78. LUTHIN G R, TABAKOFF B: Activation of adenylate cyclase by alcohols requires the nucleotide-binding protein. J.Pharmacol.Exp. Ther. 228: 579-587, 1984.
79. MAINS R E, EIPPER B A, LING N, NAKAMURA M, CHANG A C, COHEN S N, NUMA S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropine-beta lipotrophin precursor. Nature. 278: 423-427, 1979.

80. MARTIN W, EADES G: Morphine physical dependence in the dog. J. Pharm.Exp.Ther. 189: 759-771, 1974.
81. MARTIN W, EADES G: The effects of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. J.Pharm.Exp.Ther. 197: 517-532, 1976.
82. MATCHETT J A, ERICKSON K: Effects of drug-induced changes in central biogenic amines on ethanol-induced sleeptime in mice. Federation Proc. 32: 697-699, 1973.
83. McILWAIN H: Electrical influences and the speed of chemical change in the brain. Physiol. Rev. 36: 355-375, 1956.
84. McILWAIN H, JOANNY P: Characteristics required in electrical pulses of rectangular time-voltage relationships for metabolic change and ion movements in mammalian cerebral tissues. J. Neurochem. 10: 313-323, 1963.
85. MEYER H H: The Addictive States. Arch.Exp.Pathol.Pharmacol. 46: 338-436, 1901.
86. MILLER L, RANCE M J, SHAW J S, TRAYNOR J R: Conversion of dynorphin-(1-9) to leu-enkephalin by the mouse vas deferens in vitro. Eur.J.Pharm 116: 159-163, 1985.
87. MILLER R, CUATRECASAS P: Enkephalins and Endorphins. Vitamins and Hormones. 36: 297-381, 1978.
88. MUHLETHALER M, LLINAS R: Burst firing properties of deep cerebellar nuclei cells studied in the isolated guinea-pig brainstem cerebellum, in vitro. Soc. Neurosci.Abstr. 11: a-206, 1985.
89. NAKATA Y, CHANG K, MITCHELL C, HONG J S: Repeated electroconvulsive shock down regulates the opioid in rat brain. Brain Res. 346: 160-163, 1985.
90. NIKKI P, VAPAATALO H, KARPANEN H: Effect of ethanol on body temperature, postanaesthetic shivering, and tissue monoamines in halothane-anesthetized rats. Ann. Med. Exp. Biol. 49: 157-162, 1971.
91. NINKOVIC M, HUNT S P, EMSON P, IVERSEN L L: The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. Brain Res. 346: 160-163, 1981.
92. NOBLE E P, TEWARI S: Biological Aspects of Alcohol Consumption. Forsander O, N.Y., 1972. 275.



93. NOBLE E P, TEWARI S: Ethanol and brain ribosomes. Fed.Proc. 34: 1942-1947, 1975.
94. NODA M, FURUTANI Y, TAKAHASHI H, TOYOSATO M, HIROSE T, INAYAMA S, NAKANISHI S, NUMA S: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature 295: 202-206, 1982.
95. OSBORNE H, HERZ A: K-evoked release of met-enkephalin from rat striatum in vitro: effect of putative neurotransmitters and morphine. Arch. Pharmacol. 310: 203-209, 1980.
96. OSBORNE H, HOLLT V, HERZ A: Potassium-induced release of enkephalins from rat striatal slices. J.Pharmacol. 48: 219-221, 1978.
97. OSBORNE H, HOLLT V, HERZ A: Subcellular distribution of enkephalins and endogenous opioid activity in rat brain. Life Sci. 22: 611-618, 1978.
98. OTSUKA M, LONISHI S: Electrophysiology of mammalian spinal cord in vitro. Nature 252: 733-734, 1974.
99. PASTERNAK G, SNYDER S H: Opiate Receptor Binding: Effects on enzymatic treatment. Mol.Pharmacol. 10: 183-193, 1976.
100. PATEY G, DE LA BAUME S, SCHAWRTZ J C, GROS C, ROQUES B, FOURNIE-ZALUSKY M C, SOROCA-LUCAS E: Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. Science. 212: 1153-1155, 1981.
101. PERT C, SNYDER S H: Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. Science. 179: 1011-1014, 1973.
102. PERT C, SNYDER S H: Opiate receptor binding of agonist and antagonist affected differently by sodium. Opiate receptor binding of agonist and antagonist affected differently by sodium? 10: 868-879, 1974.
103. PFEIFFER A, HERZ A: Discrimination of three opiate receptor binding sites with the use of a computerized curve fitting technique. Mol.Pharmacol. 21: 266-271, 1982.
104. RABIN R A, MOLINFF P B: Multiple sites of action of ethanol on adenylate cyclase. J.Pharmacol.Exp.Ther. 227: 551-556, 1983.
105. RABIN R A, MOLINOFF P B: Activation of adenylate cyclase by ethanol in mouse striatal tissue. J.Pharm.Exp.Ther. 216: 129-134, 1981.

106. RAINIERO I, T D E G E N N A R O, VISENTIN G, BRUNETI E, CERRATO P, TORRE E: Effects of chronic ethanol treatment on alfa-MSH concentrations in rat brain and pituitary. *Neuropeptides*. 15: 139-141, 1990.
107. RAPAKA R S, VENKATESAN R, GOEHL T S, COLLINS B J: Ethanol induced conformational changes of the peptide ligands for the opioid receptors and their relevance to receptor interaction. *Life Sci*. 39: 837-842, 1986.
108. REDMAN C M: Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J.Biol.Chem*. 244: 4308-4311, 1969.
109. REICHLE F A, GOODMAN P M, REICHLE R M, LABINSKY L S, ROSEMOND G P: The effect of acute alcohol administration on brain dopamine, serotonin and norepinephrine. *Federation Proc*. 30: 1056-1061, 1971.
110. RITCHER S, WESCHE L, FREDERICKSON G: K-stimulated release of leu- and met-enkephalin from rat striatal slices: lack of effect of morphine and naloxone. *Brain Res*. 56: 103-105, 1979.
111. ROSSIER J, AUDIGIER Y, NICHOLAS L, CROS J, UDENFRIEND S: Met-enkephalin-arg-phe, present in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. *Nature*. 288: 88-90, 1980.
112. SAUERLAND E K, HARPER R M: Effects of ethanol on EEG spectra of the intact brain and isolated forebrain. *Exp. Neurol*. 27: 490-495, 1970.
113. SAWYNOK J, LABELLA F, PINSKY C: Effects of morphine and naloxone on the k-stimulated release of methionine enkephalin from slices of rat corpus striatum. *Brain Res*. 189: 483-493, 1980.
114. SCHULZ R, WUSTER M, DUKA T, HERZ A: Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology*. 68: 221-227, 1980.
115. SEIZINGER B R, BOVERMANN K, MAYSINGER D, HOLLT V, HERZ A: Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide system in discrete regions of rat and pituitary. *Pharmacol.Biochem.Behav*. 18: 361-369, 1983.
116. SEIZINGER B R, HOLLT V, HERZ A: Effects of chronic ethanol treatment on the in vitro biosynthesis of Pro-Opiomelanocortin and its posttranslational processing to b-endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *J.Neurochem*. 43: 607-613, 1984.

117. SELLINGER O Z, OHLSSON W G: Protein synthesis of free and endoplasmic reticulum-bound polysomes of rat brain. *Life Sci.* 8: 1083-1087, 1969.
118. SIMANTOV R, SNOWMAN A, SNYDER S: A morphine-like factor enkephalin in rat brain: subcellular localization. *Brain Res.* 107: 650-657, 1975.
119. SIMANTOV R, SNOWMAN A, SNYDER S H: A morphine-like factor enkephalin in rat brain: subcellular localization. *Brain Res.* 107: 650-657, 1976.
120. SMITH C M: The pharmacology of sedative hypnotics, alcohol and anesthetics sites and mechanisms of action. Springer., Heidelberg, 1977. 413-587.
121. STAIMAN A, SEEMAN P: The impulse blocking concentrations of anesthetics, alcohols, anticonvulsants, barbiturates and narcotics on phrenic and sciatic nerves. *Can.J.Pharmacol.* 52: 535-540, 1974.
122. SUN A Y: Biochemical and biophysical approaches in the study of ethanol-membrane interaction. In *Biochemistry and Pharmacology of ethanol.* Majchrowicz E., N.Y., 1979. 81-100.
123. TABAKOFF B, HOFFMAN P L: Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.* 32: 197-204, 1983.
124. TABAKOFF B, URWYLER S, HOFFMAN P L: Ethanol alters kinetic characteristics and function of striatal morphine receptors. *J. Neurochemistry.* 37: 518-521, 1981.
125. TEMPEL A, GARDNER E, ZUKIN S: Visualization of opiate receptor up-regulation by light microscopy autoradiography. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 81: 3893-3897, 1984.
126. TEWARI S, NOBLE E P: Alcohol and Abnormal Protein Biosynthesis. Oratz, N and Schreiber, SS, N.Y., 1974.
127. TEYLER T: Brain slice preparation: hippocampus. *Brain Res. Bull.* 5: 391-403, 1980.
128. TEYLER T J: The introduction of brain slices to neurophysiology. En: Schurr, Teyler (Eds). *Brain Slices: Fundamentals, Applications and Implications.* Karger, Louisville, Ky, 1-9, 1986.
129. THADANI P V, TRUITT E B: Norepinephrine turnover effects of ethanol and acetaldehyde in rat brain. *Federation Proc.* 32: 697-702, 1973.
130. UDENFRIEND S, KILPATRICK D: Biochemistry of the enkephalins and enkephalins-containing peptides. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 221: 309-323, 1983.

131. UNSWORTH C K, HUGHES J, MORLEY J S: O-sulphated Leu-enkephalin in brain. *Nature*. 296: 519-522, 1982.
132. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the met-enkephalin and leu-enkephalin content in the rat brain. *Neurosci.Lett*. 21: 39-43, 1981.
133. WAJDA J I, MAGNIGAULT I, HUDIEK P: Dopamine levels in the striatum and the effect of alcohol and reserpine. *Biochem. Pharmacol*. 26: 653-655, 1977.
134. WALKER D W, BARNES D E, ZORNETZER S F, HUNTER B E, KUBANIS P: Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 209: 711-713, 1980.
135. WILLIAMS R G, DOCKRAY G J: Differential distribution in rat basal ganglia of met-enkephalin and Met-enkephalin-arg-phe peptides reveals by immunohistochemistry. *Neuropharmacology*. 20: 891-894, 1981.
136. YAMAMOTO C: Electrical activity recorded from thin sections of the lateral geniculate body, and the effects of 5-hydroxytryptamine. *Exp. Brain Res*. 19: 271-281, 1974.
137. YAMAMOTO C, McILWAIN H: Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemical defined media in vitro. *J. Neurochem*. 13: 1333-1343, 1966.
138. YANG H Y, MAJANE E, COSTA E: Conversion of met-5-enkephalin-arg-6-phe-7 to met-5-enkephalin by dipeptidyl carboxipeptidase. *Neuropharmacology*. 20: 891-894, 1981.
139. YANG H Y, PANULA P, TANG J, COSTA E: Characterization and location of met-enkephalin-arg-phe stored in various rat brain regions. *J. Neurochem*. 40: 969-976, 1983.
140. ZAMIR N, PALKOVITS M, BROWNSTEIN M: Distribution of immunoreactive Met-enkephalin-arg-gly-leu and Leu-enkephalin in discrete regions of the rat brain. *Brain Res*. 326: 1-8, 1985.
141. ZUBIETA M, VINDROLA O, TALAVERA E, ASAI M, MASSARINI A, LINARES G: Pentylentetrazol induced seizure produce and increase release of IR-Met-enkephalin from rat striatum in vitro. *Brain Res*. 360: 101-107, 1985.

CURVA DE CALIBRACION DE ETANOL EN SANGRE.

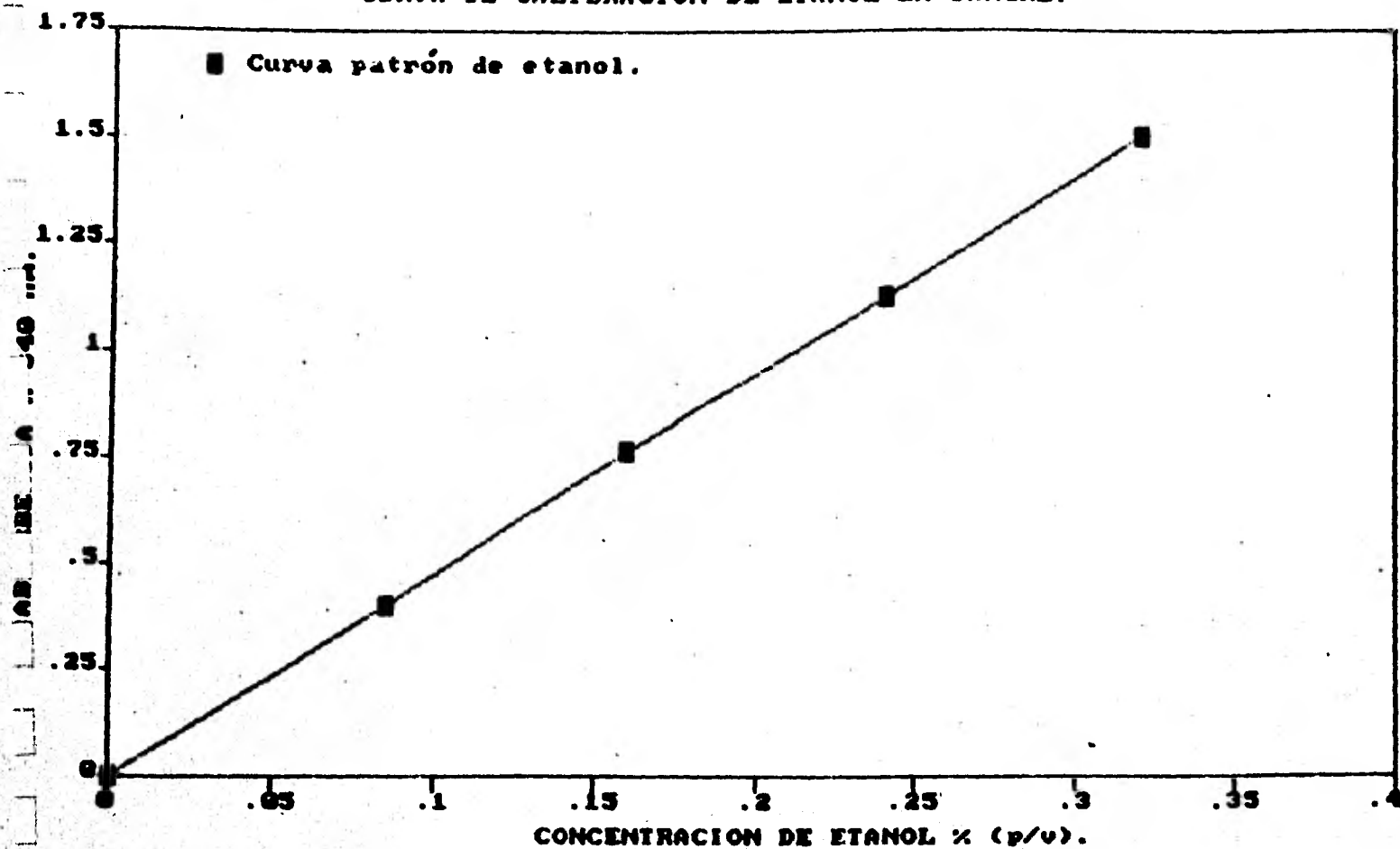


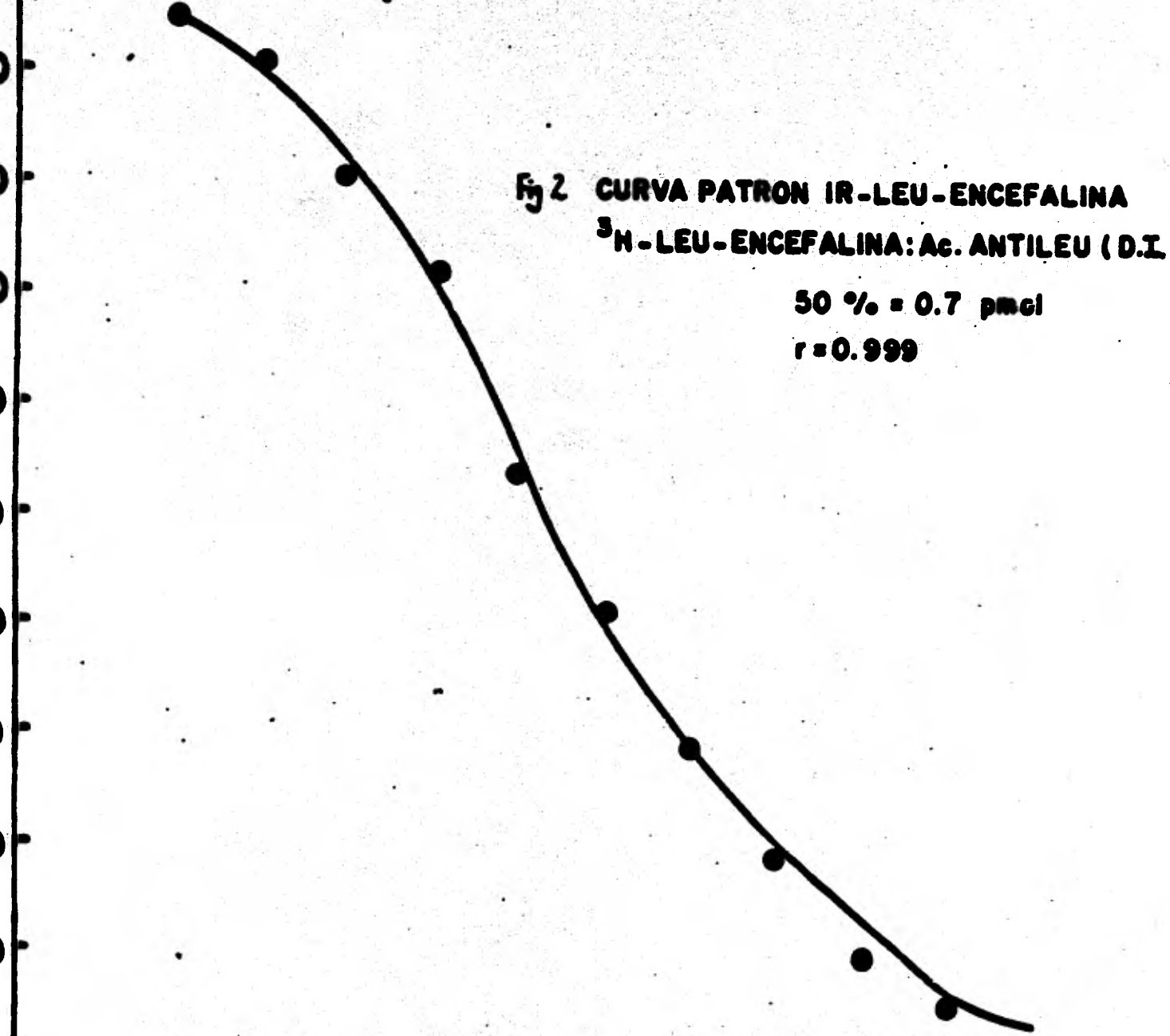
Fig.1 Para la cuantificación de etanol en sangre, se utilizó el kit 332 UV de Sigma Chemical Co. La figura muestra la curva patrón, con un límite de sensibilidad de etanol de 0.01% (p/v). La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 340 nm.

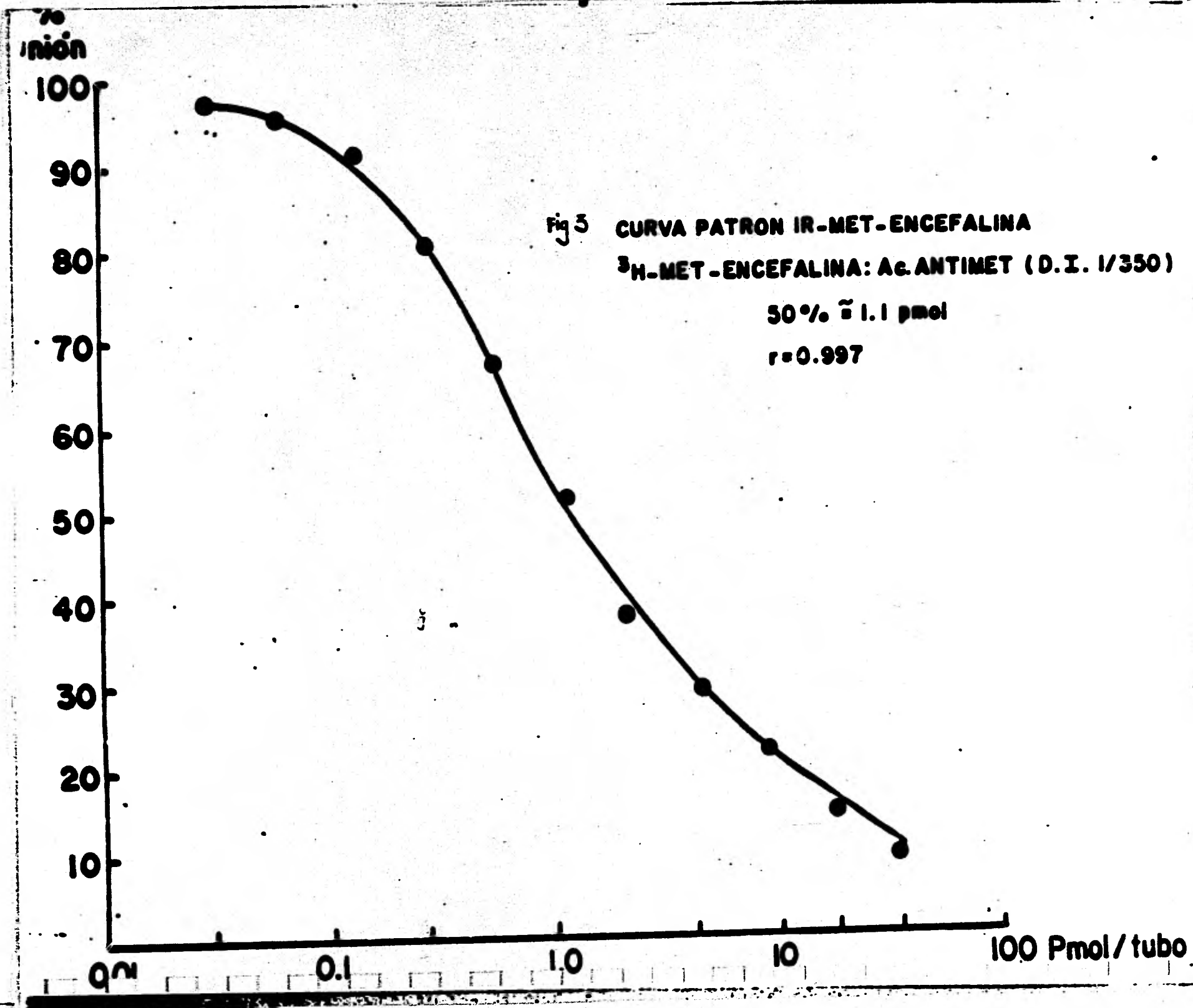
PUNION

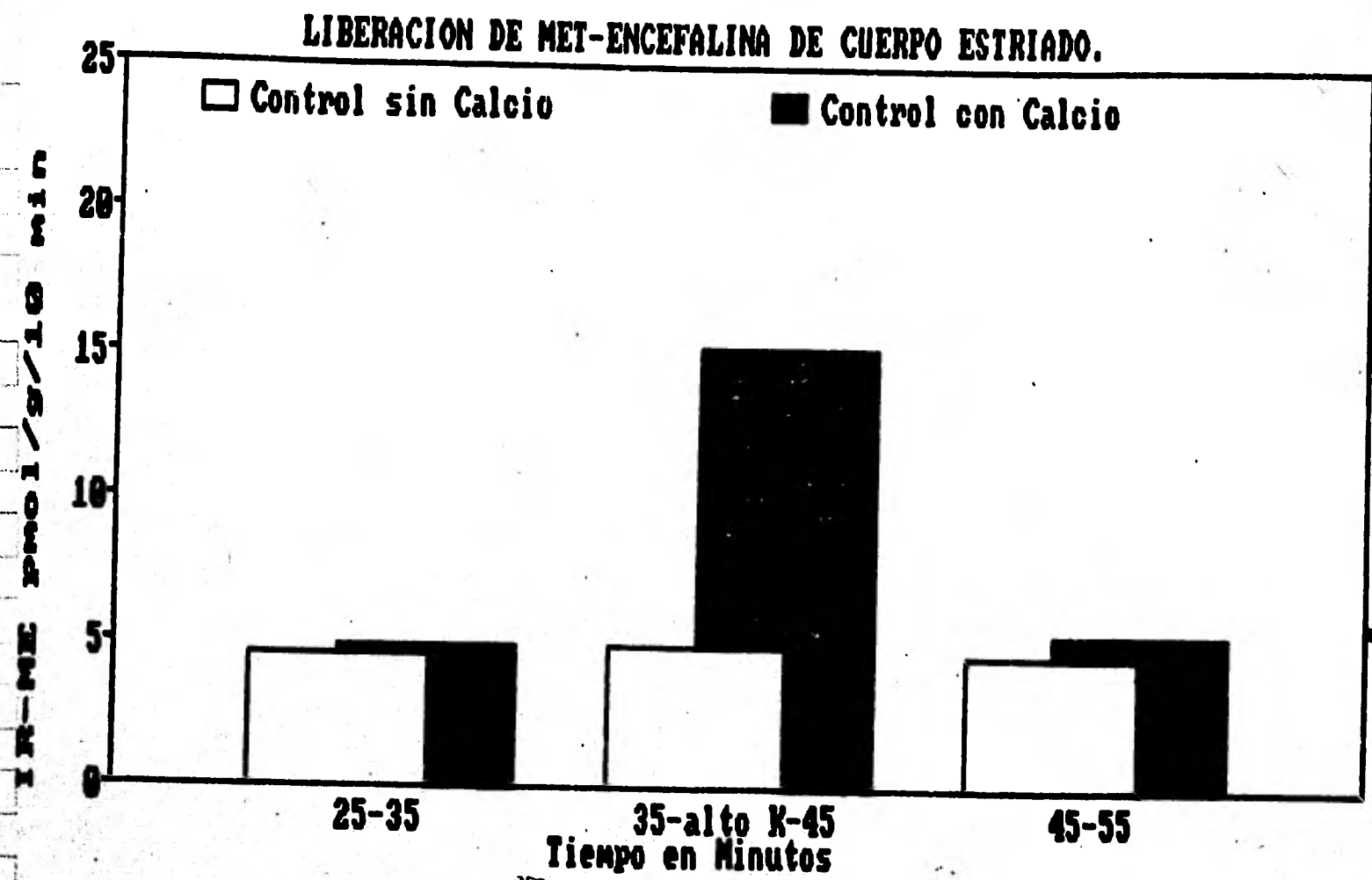
100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10

Fig 2 CURVA PATRON IR-LEU-ENCEFALINA  
<sup>3</sup>H-LEU-ENCEFALINA: Ac. ANTILEU (D.I. 1/640)  
50 % = 0.7 pmol  
r = 0.999

0.01 0.1 1.0 10 100 Pmol/tub







**Figura 4.** Liberación de Met-enkefalina de rebanadas del cuerpo estriado, en ausencia y presencia de calcio, después de la exposición a un estímulo despolarizante de potasio a una concentración de 22 mM, durante 10 minutos. Las muestras se recolectaron a intervalos de 10 minutos. Los valores se expresan como pmol/g de tejido.



### LIBERACION DE MET-ENCEFALINA DE CUERPO ESTRIADO.

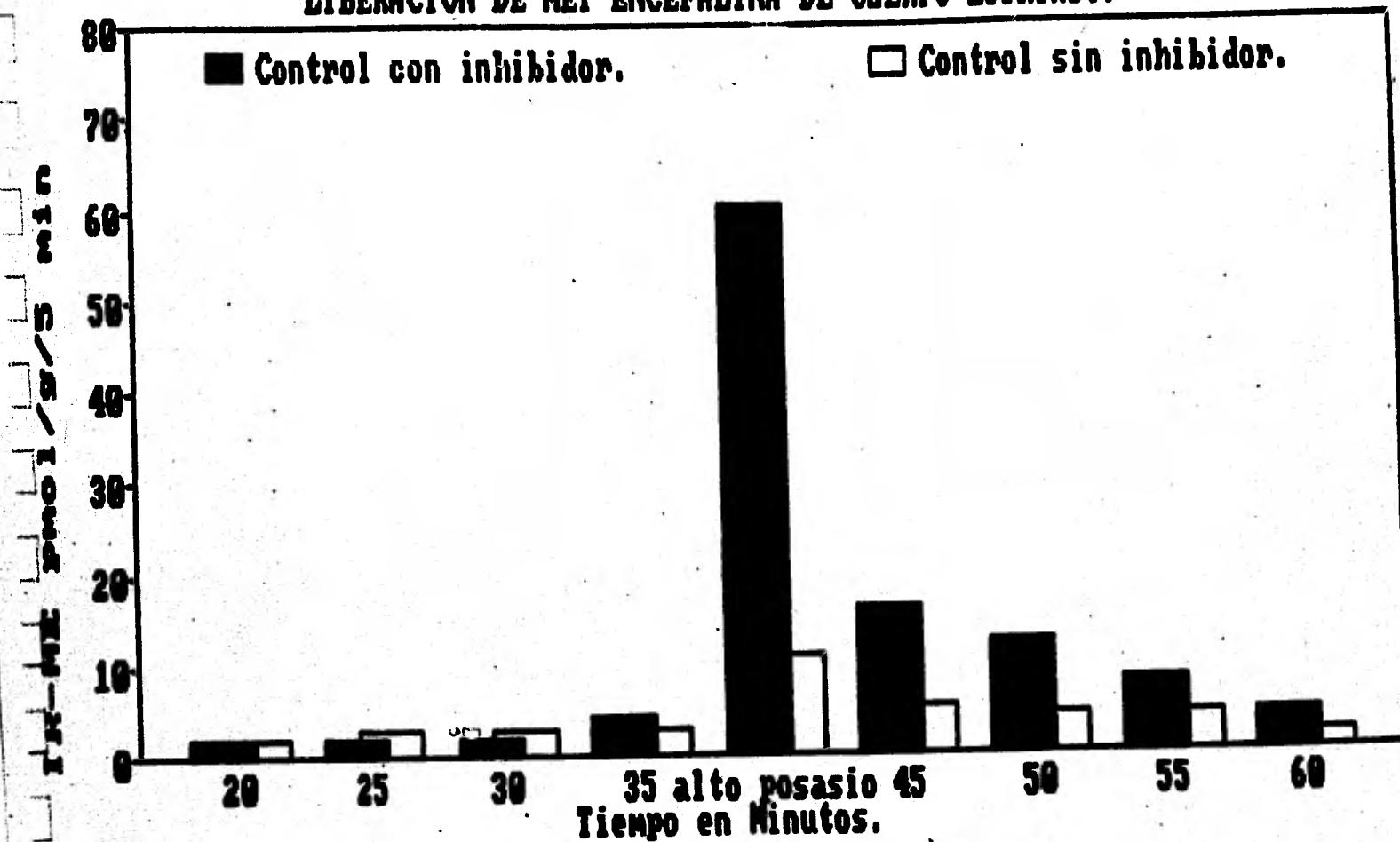


Figura 5.

Lib liberación de Met-encefalina de rebanadas del cuerpo estriado, en ausencia y presencia del dipéptido phe-ala como inhibidor enzimático a una concentración de 1 mM. Las muestras se recolectaron a intervalos de 5 minutos. Los valores se expresan como pmol/g de tejido.

### LIBERACION DE MET-ENCEFALINA DEL CUERPO ESTRIADO.

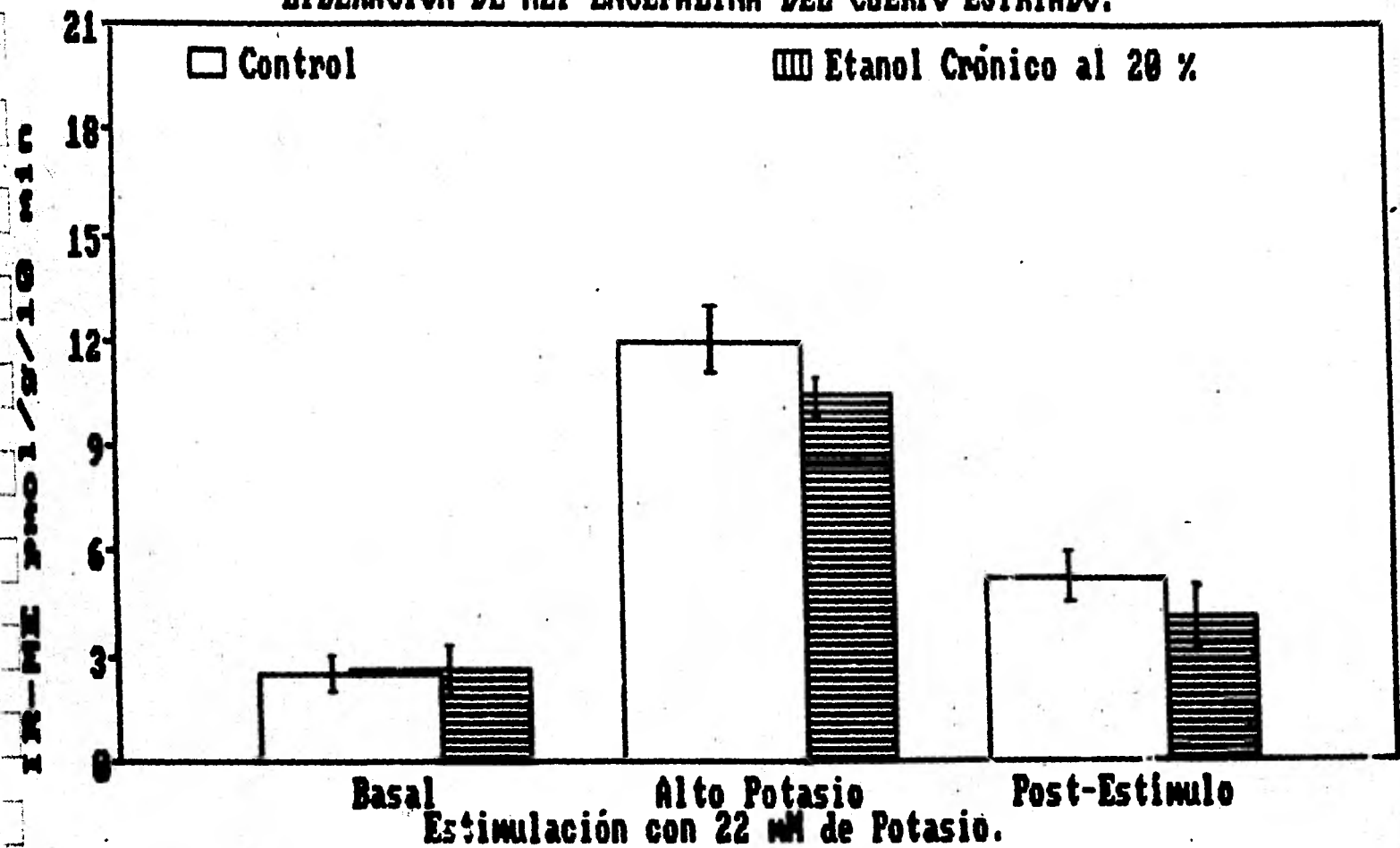


Figura 6. Liberación de Met-encefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales fueron sacrificados al término del experimento crónico con etanol. En el momento del sacrificio la concentración de etanol en agua era del 20 % (v/v). Las muestras se recolectaron a intervalos de 10 minutos. Los valores se reportan como pmol / g / 10 minutos. El experimento se realizó 2 veces (n=6). La estadística usada fue la prueba de "t"-Student

### LIBERACION DE MET-ENCEFALINA DEL CUERPO ESTRIADO.

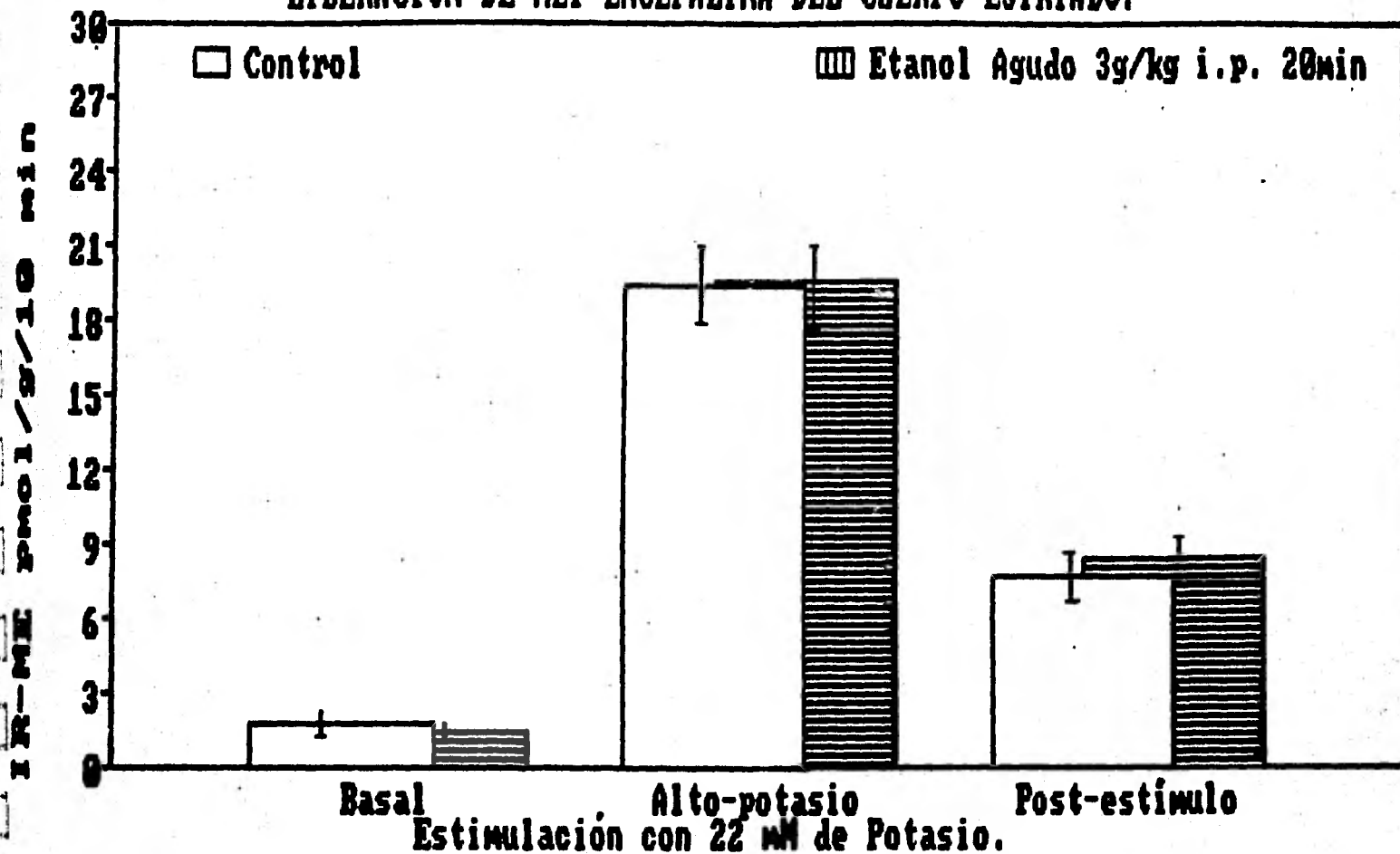


Figura 7. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 20 minutos después de la inyección de etanol por vía i.p. a una dosis de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol / g / 10 minutos. El experimento se realizó 2 veces (n=6). La estadística usada fue la prueba de "t"-Student.

### LIBERACION DE MET-ENCEFALINA DEL CUERPO ESTRIADO.

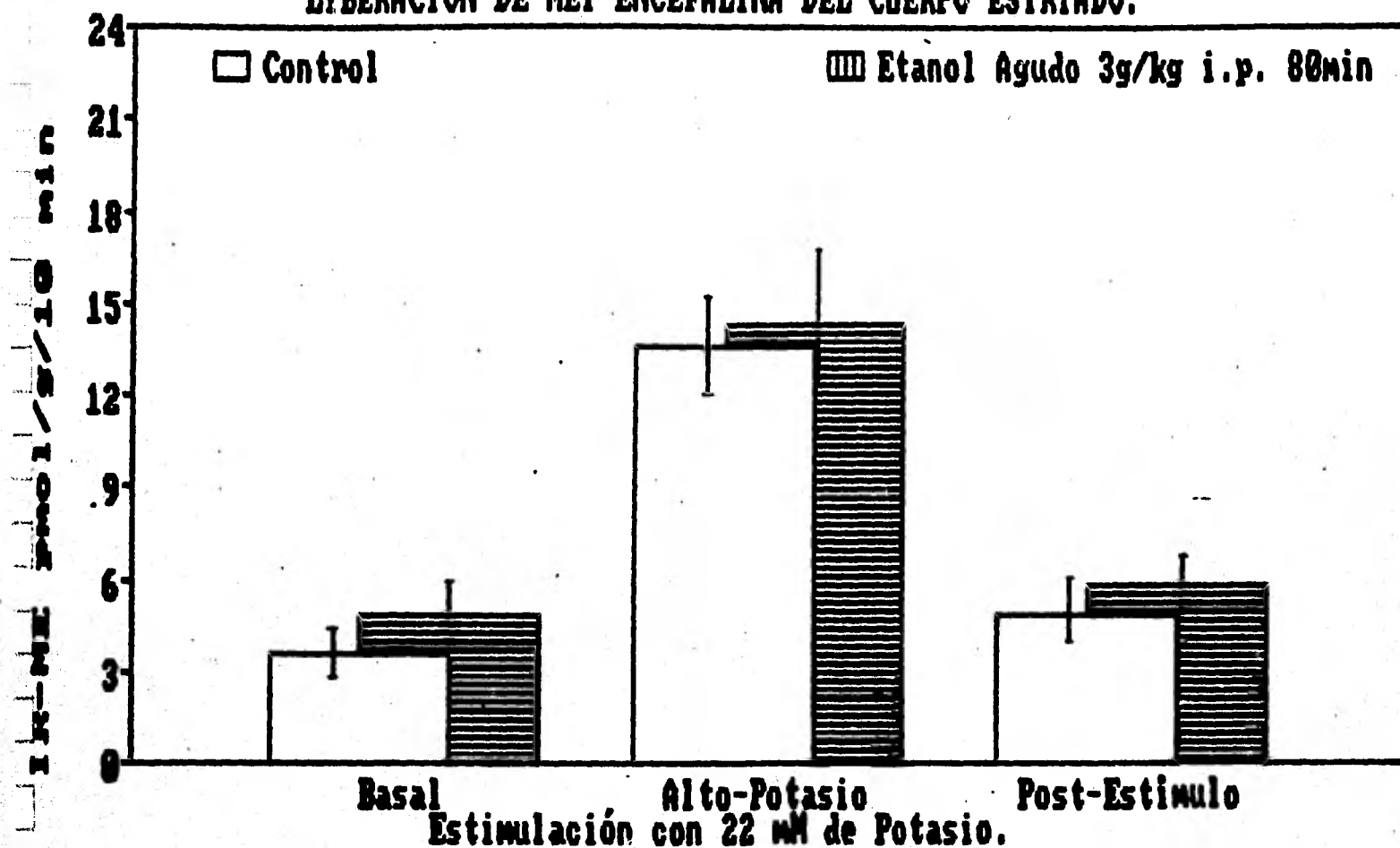


Figura 6. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 80 minutos después de la inyección i.p. de etanol a una dosis de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol / g / 10 minutos. El experimento se realizó 2 veces (n=6). La estadística usada fue la prueba de "t"-Student.

### LIBERACION DE MET-ENCEFALINA DEL CUERPO ESTRIADO.

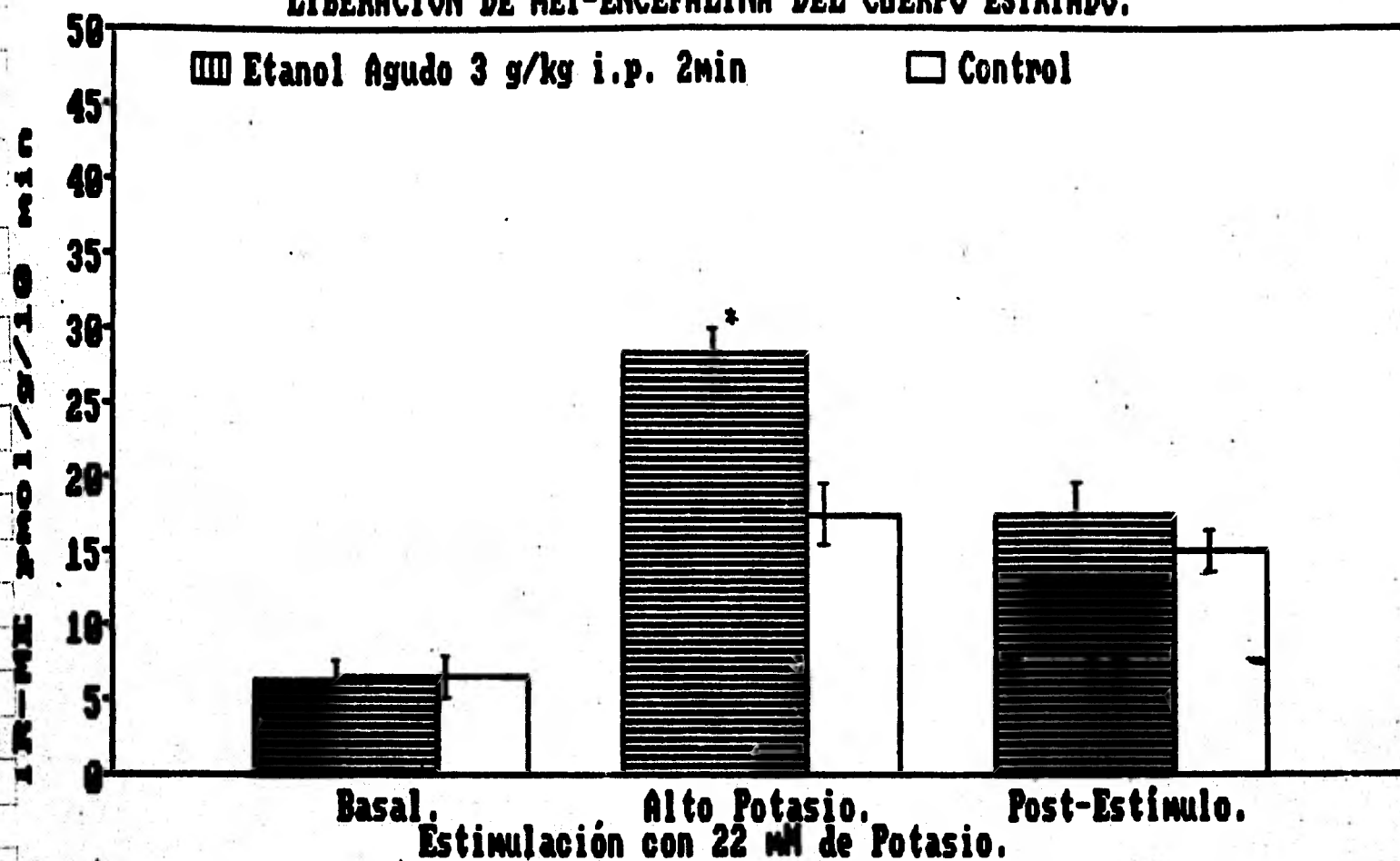
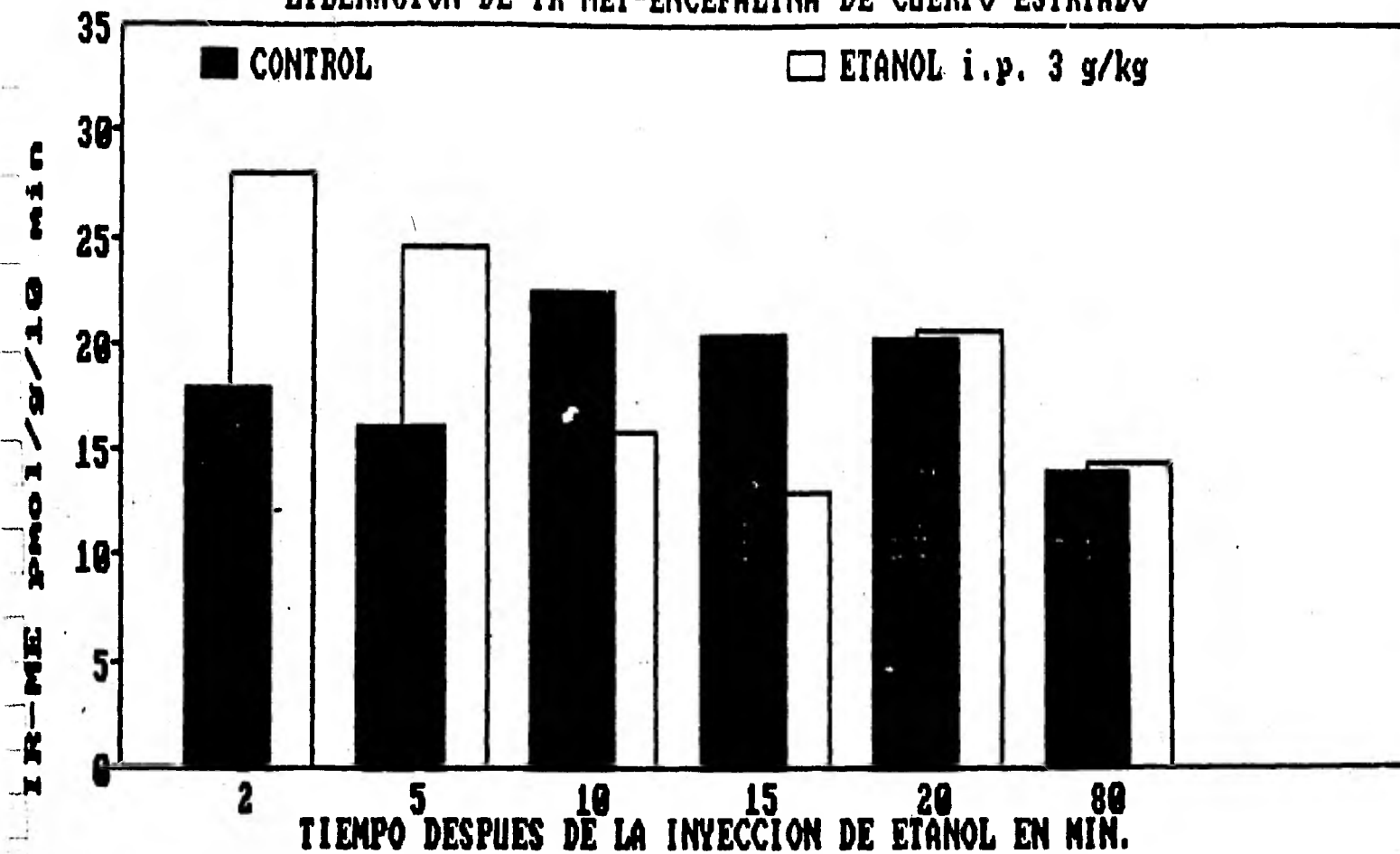


Figura 9. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 2 minutos después de la inyección de etanol por vía i.p. a una dosis de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol / g / 10 minutos. El experimento se realizó 2 veces (n=6). La significancia se calculó con la prueba de "t"-Student. \*p < 0.01

### LIBERACION DE IR-MET-ENCEFALINA DE CUERPO ESTRIADO



**Figura 10.**

Liberación de Met-encefalina de cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron a los 5, 10 y 15 minutos después de una inyección por vía i.p. de etanol a una concentración de 3 g/kg de peso. Los valores se reportan como pmol/g/10 min. La significancia se realizó usando la prueba de "t"-Student \* $p < 0.05$ . Los datos de los 2, 20 y 80 minutos se tomaron de los resultados anteriores y se colocan en una gráfica con fines comparativos.

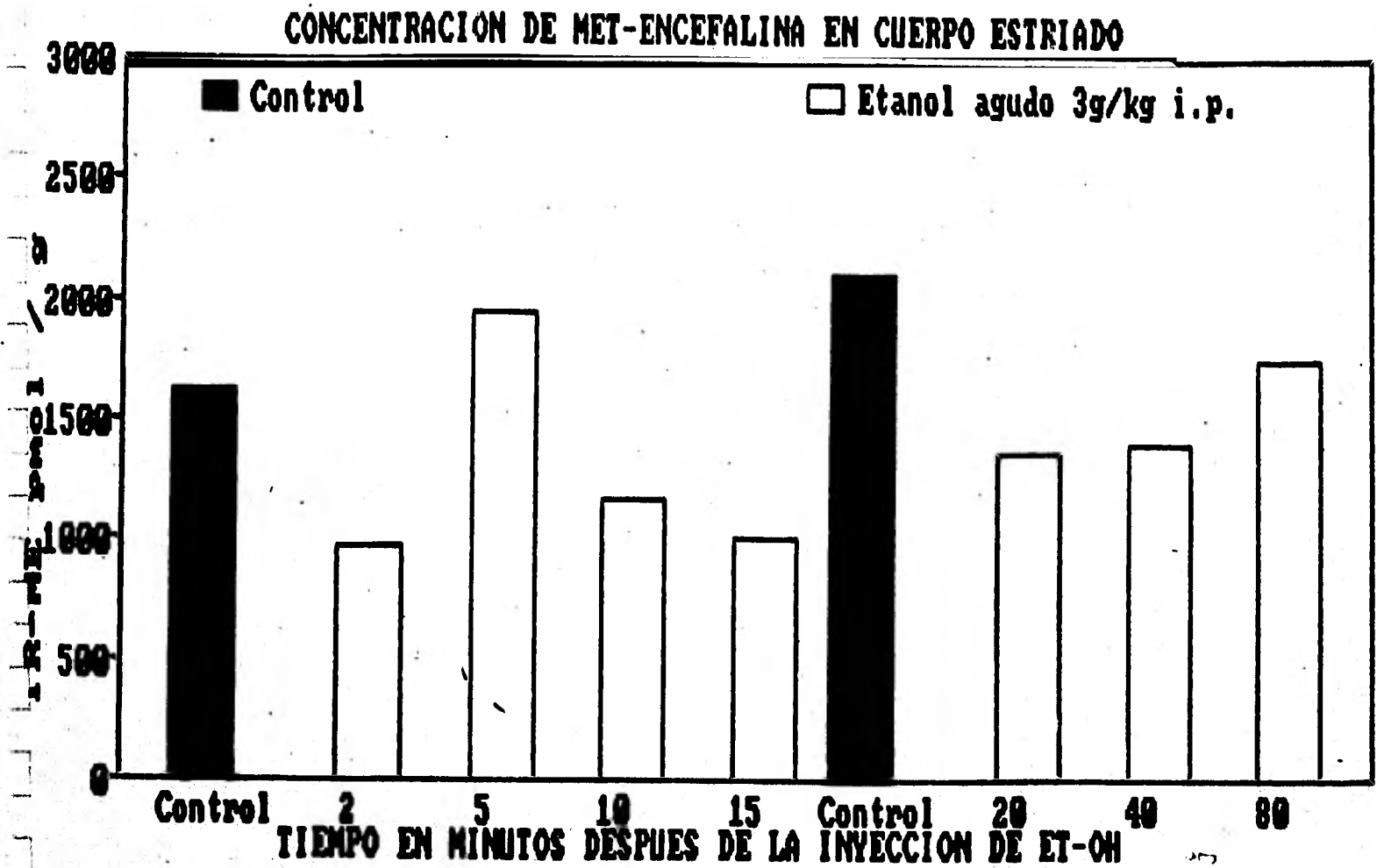


Figura 11. Concentración de Met-encefalina en el cuerpo estriado, los animales se sacrificaron después de una inyección de etanol por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol/g de tejido. El primer control corresponde a los datos de la tabla 5, el segundo a los de la tabla 3. Los resultados se colocan en una misma figura con fines comparativos. La significancia se calculó usando la prueba de "t"-Student. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$  con respecto a su control.

TABLA 4

CONCENTRACION DE LEU-ENCEFALINA CEREBRAL EN EL TRATAMIENTO  
AGUDO CON ETANOL

ESTRUCTURA	CONTROL	10 MIN.	20 MIN.	40 MIN.	80 MIN.
AMIGDALA	132 ± 6	76 ± 3**	91 ± 5**	113 ± 6	138 ± 11
ESTRIADO	321 ± 31	125 ± 8**	193 ± 11*	164 ± 4**	265 ± 9
HIPOTALAMO	240 ± 7	197 ± 5*	173 ± 4**	238 ± 4	237 ± 8
HIPOCAMPO	52 ± 2	61 ± 0.8	59 ± 1	53 ± 1	51 ± 1

Cada valor es el promedio de 9-10 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student. Las concentraciones se expresan como pmol IR-Leu-encefalina/g. de peso, con una dosis de etanol de 3 g./kg. Los valores de la concentración de etanol en el momento del sacrificio se muestran en la tabla 3. \*p<0.005, \*\*p<0.001 con respecto al control.



TABLA 3

CONCENTRACION DE MET-ENCEFALINA CEREBRAL EN EL TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL

ESTRUCTURA	CONTROL	10 MIN.	20 MIN.	40 MIN.	80 MIN.
AMIGDALA	380 ± 30	219 ± 11*	254 ± 19	297 ± 28	409 ± 22
ESTRIADO	2108 ± 120	1775 ± 127	1351 ± 70**	1402 ± 147	1745 ± 168
HIPOTALAMO	778 ± 55	628 ± 30	613 ± 31	671 ± 47	741 ± 46
HIPOCAMPO	115 ± 12	48 ± 6*	58 ± 2*	61 ± 2*	66 ± 7*
ETANOL EN SANGRE (mg / dl)	-----	429 ± 15	377 ± 3	367 ± 9	336 ± 7

Cada valor es el promedio de 9-10 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student. Las concentraciones se expresan como pmol IR-Met-encefalina/g. de peso, con una dosis de etanol de 3 g./kg. La concentración de etanol en el momento del sacrificio se expresa como mg/dl de suero. \*p<0.005, \*\*p<0.001 con respecto al control.

TABLA 2

CONCENTRACION DE MET Y LEU-ENCEFALINA EN EL CEREBRO DE LA RATA  
TRATADA EN FORMA CRONICA CON ETANOL.

ESTRUCTURA	MET-ENCEFALINA		LEU-ENCEFALINA	
	CONTROL	ETANOL	CONTROL	ETANOL
AMIGDALA	317 ± 12	229 ± 11*	92 ± 4	51 ± 3**
ESTRIADO	1834 ± 113	777 ± 20*	336 ± 22	192 ± 22*
HIPOTALAMO	724 ± 70	352 ± 30*	241 ± 12	120 ± 6**
HIPOCAMPO	95 ± 13	50 ± 2*	21 ± 2	17 ± 2

Cada valor es el promedio de 6-8 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student para muestras independientes. Las concentraciones se expresan como pmol/IR-encefalina /g de tejido. La concentración de etanol en sangre en el momento del sacrificio fue de 81 ± 10 mg/dl. \*p < 0.002; \*\*p < 0.001

**TABLA I**

**VARIACION DEL PESO CORPORAL Y ETANOL INGERIDO POR LAS RATAS SOMETIDAS AL ETANOL EN FORMA CRONICA**

DOSIS	PESO CORPORAL (g )		ETANOL INGERIDO (g )
	CONTROL*	EXPERIMENTAL	EXPERIMENTAL*
5 %	314 ± 4	385 ± 6	6.8 ± 0.2
10 %	383 ± 6	397 ± 7	9.1 ± 0.5
20 %	412 ± 7	385 ± 8	10.9 ± 0.6

La tabla muestra los cambios en el peso corporal y etanol ingerido por las ratas durante el alcoholismo crónico. Los resultados son el promedio de 12 grupos (n=60) ± S.E.M. Cada dosis de etanol se aplicó durante 15 días. Los animales control recibieron agua. \* ANOVA p<0.001

TABLA 5

CONCENTRACION DE MET-ENCEFALINA CEREBRAL EN EL  
TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL

IR-MET-ENCEFALINA EL EL CUERPO ESTRIADO

CONTROL	2 minutos	5 minutos	10 minutos	15 minutos
1632 ± 59	£ ** 978 ± 51	1938 ± 67	£ 1164 ± 132	£ * 1011 ± 95

Cada valor es el promedio de 5 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de "t"-Student. Las concentraciones se expresan como pmol IR-Met-encefalina /g de peso, con una dosis de etanol por vía i.p. de 3 g/kg. \*p 0.005, \*\*p 0.001 con respecto al control. £p 0.001 con respecto a 5 minutos.