

120



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE UNA DOSIS AGUDA DE ETANOL SOBRE LOS RECEPTORES OPIOIDES MU EN LA VIA MESO-ACCUMBENS Y MESOCORTICAL DEL CEREBRO DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MARIANA LERICHE VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: **DR. MILAGROS MÉNDEZ UBACH**



TESIS CON FALLA DE ORIGEN





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE GUATEMALA

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de una dosis aguda de etanol sobre los receptores opioides mu
en la vía meso-accumbens y mesocortical del cerebro de rata.

realizado por Mariana Leriche Vázquez

con número de cuenta 9215997-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Milagros Méndez Ubach

M. Méndez Ubach

Propietario

Dr. Osvaldo Jorge Vindrola Asti

Osvaldo Jorge Vindrola Asti

Propietario

Dra. Patricia Ileana Joseph-Bravo

Patricia Ileana Joseph-Bravo

Suplente

Dra. Martha León Olea

Martha León Olea

Suplente

Dr. Julio Roque Eduardo Morán Andrade

Julio Roque Eduardo Morán Andrade

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

[Firma]
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicatoria

A mi familia, a mis amigos y a mi bebe quienes por ser tan maravillosas personas, hacen de mi mundo, un mundo feliz..... Y sin las cuales no tendría a quien dedicar la tesis.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora: Milagros, excelente maestra y guía, por haberme enseñado, entre muchas otras cosas, como se escribe una tesis. Agradezco a las personas que participaron en la realización de este trabajo: compañeros que me apoyaron como un simple gesto de amistad y generosa solidaridad: Juan Carlos, Marcela, Rene y Octavio.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y fue financiado por CONACYT (3261P-N9607).

INDICE

	Página
Resumen	4
Lista de abreviaturas	5
Introducción	6
Generalidades	6
Sistema dopaminérgico mesolímbico	9
Sistema opioide endógeno	11
<i>Familias de péptidos opioides, funciones generales, biosíntesis, procesamiento y liberación, distribución de péptidos opioides, receptores opioides, distribución de receptores opioides, receptor mu (μ)</i>	
Efectos del alcohol sobre el sistema opioide endógeno	25
Planteamiento del problema	31
Hipótesis	31
Objetivos	32
Metodología	32
Tratamiento de los animales	32
Determinación de la concentración de etanol en plasma	32
Autoradiografía de receptores	33
Cuantificación de los autoradiograma	34
Análisis estadístico	37
Resultados	37
Discusión	44
Conclusiones y Perspectivas	54
Anexos	55
Bibliografía	56

Resumen

Evidencias bioquímicas y farmacológicas apoyan la hipótesis de que el sistema dopaminérgico mesolímbico participa de manera importante en los mecanismos de reforzamiento y recompensa del alcohol y de otras drogas de abuso. Se ha postulado que el alto consumo de etanol y sus propiedades reforzadoras podrían estar mediadas, al menos parcialmente, por un mecanismo neurobiológico que implica la activación del sistema opioide endógeno por el propio alcohol, lo cual podría aumentar el valor hedónico y las propiedades reforzadoras de la sustancia. La hipótesis de que el sistema opioide endógeno podría ser mediador de los efectos reforzadores del alcohol se apoya en numerosas evidencias obtenidas a partir de diferentes líneas de investigación. Los antagonistas selectivos y no selectivos de los receptores opioides disminuyen el consumo de alcohol en roedores, monos y humanos. Los estudios realizados en roedores y humanos sugieren que existe una predisposición genética para el desarrollo del alcoholismo, la cual podría estar asociada con una respuesta aumentada del sistema opioide al alcohol. Se ha sugerido que el alcohol podría modificar la neurotransmisión opioidérgica a través de alteraciones en la biosíntesis, el procesamiento y la liberación de los péptidos opioides, así como la unión de éstos a sus receptores. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el de investigar los efectos de una dosis aguda de etanol sobre los niveles del receptor opioide μ en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata. Ratas Wistar macho adultas recibieron una dosis aguda de etanol (2.5g/kg) por vía intragástrica y fueron sacrificadas 0.5, 1, 2, y 4 horas después de la administración. La distribución del receptor μ se estudió por autoradiografía cuantitativa de receptores usando 8 nM de [3 H]-[D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina ([3 H]- DAMGO) en cortes seriados de tejido cerebral fresco. La unión de [3 H]-DAMGO disminuyó (39.7%) significativamente en el área tegmental ventral (ATV) 30 minutos después de la administración de etanol. También se observó un decremento significativo en la unión del ligando al receptor μ en la cubierta del núcleo accumbens (19.3%) 1 h después de la administración de la sustancia. Dos horas después de la exposición a etanol, la unión de [3 H]-DAMGO aumentó significativamente en la corteza frontal (32.3%) y prefrontal (38.1%). Los cambios observados correlacionan con altos niveles de etanol en sangre. Nuestros resultados sugieren que los efectos reforzadores del alcohol podrían ser mediados, al menos parcialmente, por mecanismos de regulación positiva y negativa del receptor μ en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.

Lista de abreviaturas

[³H]- DAMGO: [³H]-[D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina

aa: aminoácido

ATV: Area Tegmental Ventral

Ci: Curies

DA: Dopamina

ECR: Estimulación Cerebral de Recompensa

GABA: Acido γ-aminobutírico

POMC: Pro-opiomelanocortina

Ratas AA: Ratas que prefieren tomar alcohol

Ratas ANA: Ratas que no prefieren el alcohol

Ratas NP: Ratas que no prefieren el alcohol

Ratas P: Ratas que prefieren tomar alcohol

Ratones C57BL/6: ratones que prefieren tomar alcohol

Ratones DBA/2: ratones que evitan tomar alcohol

SN: Substancia nigra

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Introducción

Generalidades

El alcohol es una droga de uso legal ampliamente utilizada que, dependiendo de la dosis, puede producir euforia, desinhibición, reducción de la ansiedad e hipnosis. El consumo inicial de dosis bajas de alcohol puede llevar a la ingesta progresiva de dosis cada vez mayores, a su uso continuo, al abuso y, eventualmente, a la dependencia de la sustancia, estableciéndose así la adicción a la droga. Durante el desarrollo del proceso de adicción el individuo requiere de dosis cada vez mayores para obtener el mismo efecto, fenómeno conocido como tolerancia. Una vez que el individuo se hace dependiente a la droga y deja de utilizarla presenta el síndrome de abstinencia, que dependiendo de la gravedad del caso puede incluir síntomas tales como: hiperactividad autónoma, manos temblorosas, insomnio, náuseas o vómito, alucinaciones, agitación psicomotora, ansiedad, convulsiones, etc. (Zigmond, et al. 1999).

El alcohol, al igual que otras drogas de abuso, actúa a través de mecanismos de reforzamiento tanto positivo como negativo. El término reforzamiento describe el proceso a través del cual la probabilidad de que se genere una conducta aumenta si ésta produce un efecto particular (Skinner, 1953). El reforzamiento positivo se refiere a la obtención de una sensación placentera como resultado de una conducta específica. Por ejemplo, un individuo que consume una droga, la cual le produce una sensación placentera, querrá repetir esa experiencia. El reforzamiento positivo se demuestra en un animal o en el hombre por el hecho de que realizan una tarea determinada con la finalidad de obtener una respuesta particular (i.e., la euforia que produce el alcohol). Los efectos reforzadores positivos del alcohol inducen un amplio espectro de estados subjetivos que van desde sensaciones placenteras hasta la euforia. El reforzamiento negativo involucra la reducción de una sensación no placentera o desagradable y se caracteriza por el hecho de realizar una tarea para eliminar un efecto aversivo, como la ansiedad o el dolor. Los efectos ansiolíticos del alcohol se consideran como

reforzamiento negativo (i.e. si un individuo siente ansiedad podría tomar alcohol con el propósito de eliminar esa sensación desagradable). Por lo tanto, la experiencia "agradable" de beber podría derivar de la euforia inducida por el alcohol, o bien, del alivio de una ansiedad subyacente (Pihl y Peterson, 1992). De esta manera, las propiedades reforzadoras del alcohol podrían contribuir a la ingesta inicial, al consumo continuo, al abuso y eventualmente, al desarrollo de la dependencia de la sustancia. Se ha sugerido que esto ocurre a través de la activación de circuitos neuronales específicos; tales procesos se conocen como mecanismos cerebrales de reforzamiento positivo y recompensa de drogas de abuso (Pihl y Peterson, 1992).

El sistema dopaminérgico mesolímbico es fundamental en los mecanismos de reforzamiento del alcohol, lo cual ha sido estudiado en animales mediante un procedimiento experimental conocido como estimulación cerebral de recompensa (ECR) o auto-estimulación intracraneal (Olds y Milner, 1954). En este modelo los animales tienen implantado un electrodo en áreas específicas del cerebro (i.e. el área tegmental ventral) y aprenden a aplicarse pequeñas descargas eléctricas para producirse estimulación de recompensa. En este modelo se ha demostrado que el alcohol aumenta la frecuencia de auto-estimulación (Bain y Kornetski, 1989) y disminuye el umbral de la ECR, de manera que se requiere de una menor corriente eléctrica para obtener el mismo comportamiento de auto-estimulación (Moolten y Kornetski, 1990). La reducción del umbral de la ECR se presenta poco después de la administración de alcohol y coincide con el momento en el cual la concentración de etanol en sangre está aumentando. Durante la fase de disminución de la concentración de etanol en sangre, no se observa el aumento en ECR (Lewis y June, 1990). Estos estudios demuestran que el alcohol, como otras drogas de abuso facilita la ECR y tiene efectos reforzadores. Se ha sugerido que estos procesos están relacionados con una actividad aumentada del sistema dopaminérgico mesolímbico.

Los mecanismos de reforzamiento positivo del alcohol se estudiaron en varios modelos experimentales. El desarrollo de líneas de roedores seleccionadas genéticamente para manifestar diferentes preferencias por la sustancia, ha sido de particular utilidad para identificar algunos de los sustratos neurales y de los sistemas de neurotransmisores implicados. Algunos estudios demuestran que las ratas que prefieren alcohol (P) se

auto-administran la substancia en regiones especificas del cerebro como el ATV, lo cual sugiere que el consumo de alcohol se debe a su efecto farmacológico en el cerebro (Gatto et al., 1990; Mc Bride et al., 1991).

Las evidencias conductuales comentadas anteriormente, así como estudios farmacológicos sugieren que el sistema dopaminérgico mesolímbico (Figura 1) juega un papel fundamental en los mecanismos de reforzamiento del alcohol. Diversos estudios bioquímicos han mostrado que el alcohol, tanto *in vivo* como *in vitro*, afecta de manera importante eventos de la transmisión dopaminérgica de esta vía. Por ejemplo, el alcohol aumenta la síntesis, la liberación (Di Chiara e Imperato, 1985; Imperato y Di Chiara 1986) y el recambio de dopamina en el núcleo accumbens, así como la frecuencia de disparo de los somas dopaminérgicos localizados en el ATV (Gessa et al., 1985). También se observó que la administración de algunos agonistas dopaminérgicos reduce la ingesta de alcohol, mientras que la de antagonistas la aumenta. Algunos trabajos sugieren que los receptores D₂ están implicados en estas respuestas (Mc Bride et al., 1990).

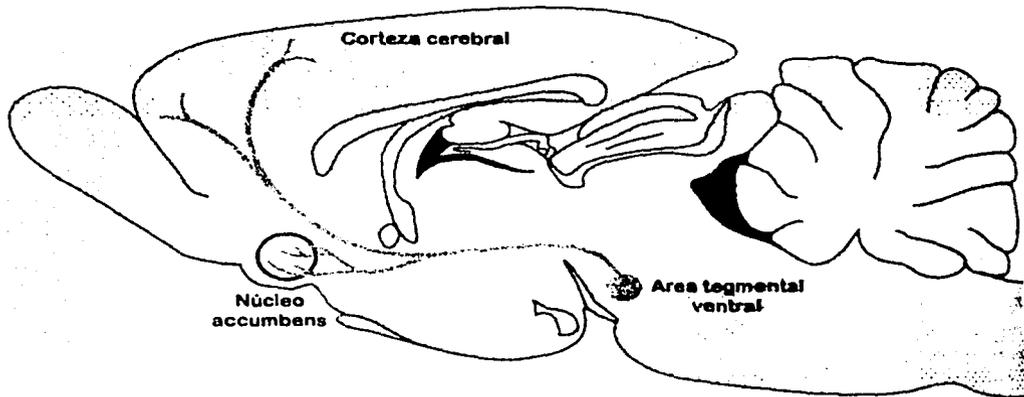


Figura 1. Circuitos cerebrales activados por las drogas de abuso. Representación esquemática del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, cuyos somas se encuentran en el ATV y proyectan sus axones hacia el núcleo accumbens y la corteza prefrontal. Modificado de Siegel et al. (1999).

Gracias a los estudios que se han hecho sobre los mecanismos de acción de drogas que, como el alcohol, son fuertemente reforzadoras y adictivas, ahora se sabe que esta sustancia afecta varios circuitos de neurotransmisores y/o neuromoduladores, tales como el de la serotonina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato y el sistema opioide endógeno. Los péptidos opioides juegan un papel importante en las conductas de un consumo alto de alcohol (Gianoulakis, 1993; Hunt, 1993; Ulm et al., 1995) y, como se verá más adelante, el sistema opioide endógeno podría actuar como mediador de las acciones reforzadoras del alcohol.

Sistema dopaminérgico mesolímbico

Los efectos de reforzamiento positivo de las drogas de abuso son mediados por múltiples sistemas que convergen en blancos comunes en el cerebro. El sistema dopaminérgico mesolímbico es uno de los principales sustratos de las drogas de abuso. Los principales componentes anatómicos del sistema dopaminérgico mesolímbico son: el área tegmental ventral (ATV) y el cerebro anterior basal (núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza frontal y amígdala) (Zigmond et al., 1999) (Figuras 1 y 2).

El sistema dopaminérgico mesolímbico está organizado topográficamente de manera precisa (Figura 2 y Tabla 1). Los grupos celulares dopaminérgicos han sido clasificados en dos grupos principales con base en sus proyecciones eferentes:

- 1) Los sistemas mesolímbico y mesocortical, cuyos somas están localizados en el ATV y proyectan sus axones hacia áreas límbicas y corticales (Kandel et al., 1991).
- 2) El sistema nigroestriatal, cuyos somas están localizados en la sustancia nigra (SN) y proyectan sus axones hacia diversas áreas del estriado (Kandel et al., 1991).

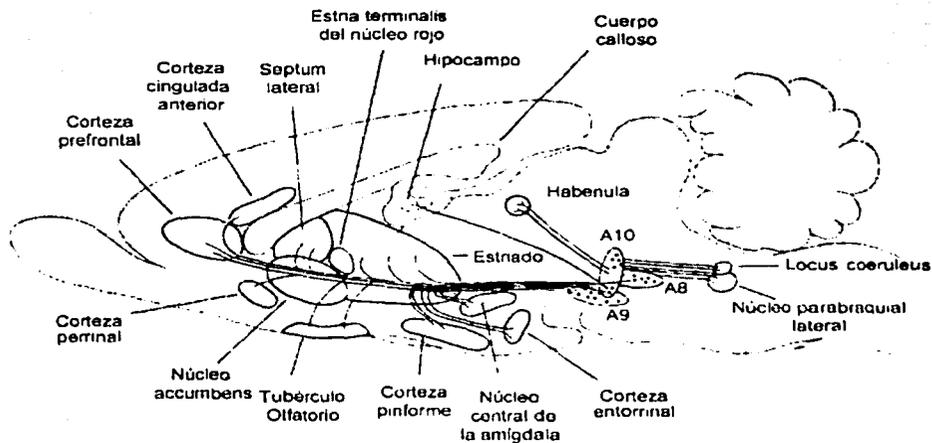


Figura 2. Sistema dopaminérgico mesolímbico. Los cuerpos celulares de las vías dopaminérgicas mesoaccumbens y mesocortical se localizan en el área A10 (área tegmental ventral), mientras que los de la vía nigroestriatal se encuentran en A9 (sustancia nigra) (Modificado de Kandel 1991).

Tabla 1. Organización de los grupos celulares dopaminérgicos.

Sistema	Células de origen	Proyecciones
<i>Mesolímbico y mesocortical.</i>	ATV (área A10) (y algunas de A9)	Áreas límbicas y corticales: Núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, cortezas cingulada, prefrontal, piriforme y entorrinal, habénula, septum, amígdala, <i>locus coeruleus</i> .
<i>Nigroestriatal</i>	Sustancia nigra (área A9)	Áreas estriales incluyendo el caudado putamen, el globo pálido, los núcleos subtalámicos y la neocorteza

(Modificado de Kandel et al., 1991.)

Sistema opioide endógeno

Familias de péptidos opioides

Existen principalmente tres familias de péptidos opioides: las endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas, las cuales provienen de tres genes distintos. A principios de la década de los 60's Kosterlitz propuso la existencia de sustancias endógenas con propiedades similares a las de la morfina. En 1974, Huges logró purificar, a partir de homogenados de cerebro de cerdo, una sustancia con propiedades parecidas a las de la morfina, cuyos efectos eran revertidos por naloxona y naltrexona (Huges, 1975). Al siguiente año, Huges y Kosterlitz reportaron la secuencia de dos pentapéptidos aislados de tejido cerebral que llamaron encefalinas (Huges et al., 1975a). Ese mismo año se reportó un compuesto aislado de la hipófisis de ganado bovino y porcino que se comportaba como la morfina (Huges et al., 1975b). A este compuesto de 31 residuos de aminoácidos (aa) se le llamó β -endorfina (Li y Chung, 1976). La dinorfina, que es considerada el agonista endógeno del receptor opioide κ fue aislada a partir de la pituitaria de cerdo (Goldstein et al. 1981). La secuencia de estos péptidos se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Estructura de los péptidos opioides, sus precursores y su selectividad por los receptores opioides.

Precursor	Péptido opioide	Estructura	Selectividad (receptores)
Pro-opiomelanocortin a (POMC)	β -Endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys- Asn-Ala-Tyr-Lys-Gly-Glu	$\mu > \delta \gg \kappa$
Proencefalina A	[Leu ⁵]Encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$\delta > \mu \gg \kappa$
	[Met ⁵]Encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	
	[Met ⁵]Encefalina-Arg ⁶ - Phe ⁷	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	$\mu \approx \delta \gg \kappa$ κ
Prodinorfina (Proencefalina B)	Dinorfina A (1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg- Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-	$\kappa \gg \mu > \delta$
	Dinorfina A (1-13)	Aso-Asn-Gly Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-	$\kappa > \delta \approx \mu$
	Dinorfina A (1-8)	Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg- Ile	$\kappa > \delta \approx \mu$

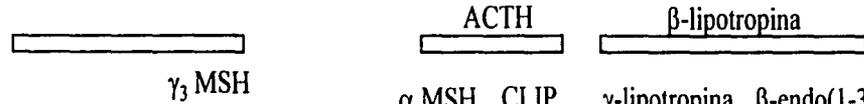
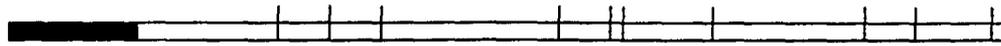
Los primeros 4 aminoácidos de todos estos péptidos son iguales.

>> = Afinidad considerablemente mayor que

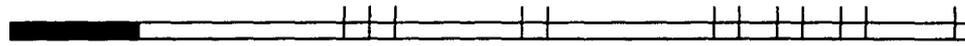
Tomado de Borsodi y Thoth (1995)

Los tres tipos de péptidos opioides mencionados provienen de precursores diferentes (Figura 3). A partir de la Proopiomelanocortina (POMC) se origina la β -lipotropina, la cual sirve como prohormona para generar las α -, β - y γ - endorfinas. La Leu- y Met-encefalinas son pentapéptidos que se derivan de la Proencefalina y difieren entre sí únicamente en el último aminoácido (aa) del lado carboxilo terminal. Las dinorfinas son péptidos opioides derivados de un precursor diferente, la Prodinorfina. En la tabla 2 se muestran los precursores de los péptidos opioides con su estructura y su selectividad por los receptores opioides (Strand et al. 1999).

A POMC



B Proencefalina



C Prodinorfina

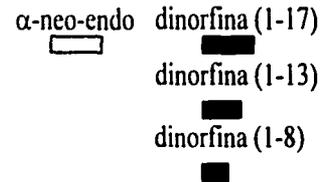
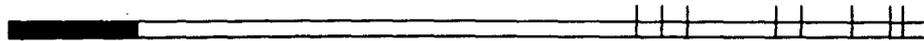


Figura 3. Familias de péptidos opioides. Cada una de las moléculas precursoras produce múltiples fragmentos peptídicos biológicamente activos. En esta figura se muestran alrededor de la mitad de éstos. La Proopiomelanocortina (POMC) (A) da origen a la β-endorfina (β-endo), la hormona estimulante de melanocitos (MSH), la hormona adenocorticotrópica (ACTH) y al péptido parecido a la corticotropina (CLIP). La Proencefalina (B) da origen a múltiples copias de Met-enkefalina (ME), una de Leu-enkefalina (LE) y varios péptidos extendidos en el lado carboxilo terminal, tales como: Met⁵-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (ME-RGL) y los péptidos E, F y B. La Prodinorfina (C) da origen a la dinorfina (1-17, 1-13 y 1-8) y a la neoendorfina (α-neo-endo). Las dinorfinas contienen la secuencia de la LE en su extremo amino terminal. Tomado de Fields, 1987. (ver anexo I).

Funciones generales

Los péptidos opioides están amplia y diferencialmente distribuidos en el cerebro y la médula espinal, así como en el tracto gastrointestinal. Actúan como neuromoduladores ejerciendo una profunda influencia sobre diversos estados fisiológicos y patológicos, incluyendo funciones cardiovasculares y gastrointestinales. Los opioides deprimen al sistema respiratorio y pueden causar hiperglicemia y akinesia; también interactúan con el sistema neuroendócrino y el sistema inmune, cuyos linfocitos tienen receptores para opioides (Strand, 1999).

Los opioides producen una inhibición de la frecuencia de disparo de neuronas involucradas en la recepción de información nociceptiva, como la percepción del dolor. Los opioides provocan una hiperpolarización de la membrana y reducen la amplitud de los potenciales sinápticos. Esta acción inhibitoria puede llevarse a cabo en diversas áreas cerebrales (Strand, 1999). La β -endorfina y la dinorfina inhiben la frecuencia de disparo de la mayoría de las neuronas del hipotálamo y esta inhibición se bloquea por sus antagonistas (Lin y Pan, 1994). Así, los péptidos opioides inhiben la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores, principalmente epinefrina, dopamina, acetilcolina y sustancia P (Strand, 1999).

El sistema opioide interactúa con diversos sistemas de neurotransmisores y hormonas y se altera por varios tipos de estresores. Los opioides están involucrados en la regulación del dolor y es bien conocido su efecto analgésico. También participan en los procesos de aprendizaje, memoria y conducta sexual (Strand, 1999).

Los opioides también ejercen marcados efectos en el estado de ánimo y la motivación. En el humano, la administración de opiáceos produce euforia y a largo plazo, tolerancia y dependencia física a la droga. Los opiáceos activan las vías cerebrales de recompensa, un proceso que consecuentemente lleva a la adicción (Strand, 1999). Se ha sugerido que el sistema opioide endógeno regula la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico mediante la activación de los receptores opioides en esta vía, lo cual podría contribuir a sus efectos reforzadores.

Biosíntesis, procesamiento y liberación

Los péptidos opioides se sintetizan a partir de grandes moléculas precursoras (de entre 10 y 35 KD), las cuales se procesan post-traduccionalmente de manera específica dependiendo de las enzimas que se encuentran en cada tejido.

La POMC da origen a varios neuropéptidos con actividad biológica. Estos péptidos están distribuidos diferencialmente en diversas áreas del cerebro. En el lóbulo anterior de la hipófisis, la POMC produce principalmente la hormona adenocorticotrópica (ACTH), β -lipotropina y β -endorfina. Por otra parte, en el lóbulo intermedio de la hipófisis, la POMC es procesada a péptidos más pequeños tales como: la α -hormona melanocito estimulante (α -MSH), la γ -lipotropina, la β -endorfina y el péptido parecido a la corticotropina (CLIP), entre otros (Figura 3). También se pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la β -endorfina, que se encuentra en su forma activa en el lóbulo anterior, es acetilada en el lóbulo intermedio, perdiendo así su actividad biológica. El ARNm de la POMC se encuentra en niveles altos en la amígdala y en el hipotálamo, mientras que el núcleo accumbens y la sustantia nigra contienen densidades bajas de ARNm (Tabla 5).

La Proencefalina es una molécula precursora que contiene una copia de Leu-encefalina, cuatro copias de Met-encefalina y una copia de varios péptidos como la Met-encefalina extendida en el lado carboxilo terminal (Met-encefalina-Arg-Gly-Leu, ME-RGL) (Figura 3). El ARNm de la Proencefalina se encuentra en todo el cerebro y está densamente distribuido en prácticamente todos los núcleos del tálamo y la amígdala. Por el contrario, la densidad de este precursor en la sustancia nigra y el ATV es baja (Tabla 5).

La Prodinorfina es una molécula precursora que se procesa para producir varios péptidos relacionados estructuralmente con la Leu-encefalina. La Prodinorfina da origen a las dinorfinas 1-17, 1-13 y 1-8, y a la α -neo-endorfina, entre otros péptidos biológicamente activos (Figura 3). Los productos de la prodinorfina también pueden variar dependiendo del tejido donde son procesados, produciendo primero los péptidos que tienen alta afinidad por un determinado tipo de receptor (la dinorfinas 1 a 17 y la α -neo-endorfina, que se unen al receptor κ) y posteriormente produciendo Leu-encefalina, la cual tiene alta afinidad por el receptor δ . El ARNm de la Prodinorfina está ampliamente distribuido en el cerebro, encontrándose en densidades altas en algunos núcleos del hipotálamo y en la sustantia nigra; en contraste, se encuentran bajos niveles de este precursor en la corteza y la amígdala (Tabla 5).

Los opioides, como otros neuropéptidos, se almacenan en vesículas electrodensas, relativamente grandes (>70 nm) y su liberación es dependiente de Ca^{2+} (Strand et al. 1999).

Los péptidos opioides son liberados en respuesta a diversos estímulos. Por ejemplo, el estrés aumenta la liberación de Met-encefalina de la médula adrenal (Strand et al. 1999). Por otra parte, algunas sustancias también afectan su liberación: bajas concentraciones de etanol aumentan la liberación de β -endorfina en células hipotalámicas en cultivo (Gianoulakis, 1990).

La inactivación de los péptidos opioides liberados al espacio sináptico se puede llevar a cabo de manera muy rápida mediante la acción de peptidasas. Por ejemplo, se ha sugerido que las encefalinas son degradadas por diversas enzimas tales como la aminopeptidasa MII (Schwartz et al., 1981) y la endopeptidasa 24.11 (White et al., 1985).

Distribución de péptidos opioides

Los péptidos opioides están ampliamente distribuidos en el Sistema Nervioso Central (SNC) y periférico (SNP). En el SNC existen principalmente dos grupos celulares que producen β -endorfina. El más importante se encuentra en el núcleo arcuato del hipotálamo; estos grupos celulares proyectan sus axones a muchas áreas del sistema límbico y del tallo cerebral. El segundo grupo celular se encuentra en el tracto solitario y en el núcleo commissuralis (Akil et al., 1984). La β -endorfina se encuentra en altas densidades en regiones del cerebro tales como los núcleos del hipotálamo. Por ejemplo, en el hipotálamo medio basal la concentración de β -endorfina es de 375 pg/ μ g de proteína. En cambio, la β -endorfina se encuentra en pequeñas cantidades en el núcleo accumbens (0.7 pg/ μ g de proteína) y la amígdala (0.35 pg/ μ g de proteína) (Tabla 3) (Rasmussen et al. 1998).

Las encefalinas (Met- y Leu-encefalina) también se encuentran ampliamente distribuidas en el SNC. Se han encontrado somas celulares que producen encefalinas en el caudado putamen y el área hipotalámica lateral entre otras; y al parecer sus terminales nerviosas se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro (Akil et al., 1984). Por ejemplo, la Met-encefalina se encuentran en altas concentraciones en el hipotálamo (15.23 pmolas/mg de proteína) y en el caudado putamen (11.2 pmolas/mg de proteína) y en bajas densidades en el hipocampo (2.26 pmolas/mg de proteína) y en la corteza (3.59 pmolas/mg de proteína) (Tabla 3). (Tejwani y Rattan, 1997)

Los grupos celulares que producen dinorfina se localizan en varios núcleos del hipotálamo y del tallo cerebral (Akil et al., 1984). La dinorfina se encuentra diferencialmente distribuida en el cerebro. Por ejemplo, la dinorfina 1-13 se presenta a una concentración de 7.89 pmolas/mg de proteína en el hipotálamo, mientras que en el caudado putamen la concentración es considerablemente menor (0.66 pmolas/mg de proteína) (Tabla 3). (Rattan y Tejwani, 1997)

Tabla 3. Distribución de péptidos opioides en el cerebro de la rata.

Región del SNC	β -endorfina	Encefalina	Dinorfina
Telencéfalo			
Corteza entorrinal	3	--	--
Formación Hipocampal			
<i>Hipocampo</i>	--	2	3
<i>Giro dentado</i>	--	2	3
Tubérculo olfatorio	--	2	2
Núcleo accumbens	1	3	2
Caudado putamen	--	3	2
Globo pálido	--	5	4
Septum	3	3	--
Núcleo de la cama de la estria terminal	4	3	--
Diencéfalo			
Hipotálamo			
<i>Núcleo supraóptico</i>	--	1	3
<i>Núcleo paraventricular</i>	4	4	3
<i>Núcleo arcuato</i>	5	3	2
<i>Área hipotalámica lateral</i>	3	2	3
Tálamo			
<i>Núcleo paraventricular</i>	4	4	3
Mesencéfalo			
Substancia nigra			
<i>Pars compacta</i>	1	1	--
<i>Pars reticulada</i>	--	--	4
Substancia gris periacueductal	4	3	2
Colículo superior/inferior	2	3	--
Núcleo dorsal de rafé	4	3	2

5= densidad muy alta; 4= densidad alta; 3= densidad moderada; 2= densidad baja; 1= densidad muy baja

--=no detectable

Tabla basada en la revisión de Akil et al., (1984)

Receptores opioides

En el año de 1971 Goldstein y colaboradores desarrollaron métodos para la detección de los receptores de opio en membranas neuronales. Posteriormente la existencia de receptores opioides fue demostrada por experimentos de unión usando ligandos opiáceos marcados radioactivamente (Pert y Snyder, 1973; Simon et al. 1973; Terenius, 1973). Martin y colaboradores (1976) reportaron la primera evidencia farmacológica de que existían varios tipos de receptores opioides basándose en la acción farmacológica de varios opiáceos y sus derivados; de esta manera postularon al receptor μ (de morfina) y

al kapa (κ de ketociclazocina). Lord y sus colaboradores (1973) encontraron un receptor al cual se unían con alta afinidad las encefalinas y lo llamaron receptor δ , ya que fue caracterizado en el *vas deferens* de la rata. Estas primeras investigaciones han sido ampliadas por estudios anatómicos, farmacológicos, bioquímicos y conductuales, que demuestran la existencia de distintos subtipos de receptores opioides en el cerebro y en tejidos periféricos.

Las endorfinas tienen mayor afinidad por los receptores μ , y las encefalinas por los receptores δ (Chang y Cuatrecasas, 1981. Chang et al., 1979. Rainor et al., 1994). Las sustancias del tipo de la morfina tienen alta afinidad por el subtipo de receptor opioide μ . De igual manera, las sustancias similares a las encefalinas tienen una alta afinidad por el receptor δ y las sustancias parecidas a la dinorfina tienen alta afinidad por el receptor κ (Tabla 4). Algunos investigadores han hecho una clasificación más fina de los subtipos de receptores basándose en estudios farmacológicos y de unión a receptores y se han caracterizado, por ejemplo, receptores μ_1 y μ_2 (Pasternak et al., 1983), δ_1 y δ_2 (Portoghese et al., 1992) o κ_1 y κ_2 (Attali et al., 1982).

Tabla 4. Receptores opioides, agonistas y antagonistas.

Subtipos de receptor	μ	δ	κ
Agonistas	β -endorfina dihidromorfina oximorfona DAMGO morficeptina β -casomorfina PL-017	morfina [Met]encefalina [Leu]encefalina DADLE DSTLE DAMEA DPDPE	dinorfina ketociclazocina Tifudoma Bramazocina U 50488 U-69593 Mr 2034
Antagonistas	naloxona naltrexona β -funaltrexamina CTOP	naloxona naltrexona ICI 154, 129 ICI 171, 864	naloxona naltrexona Mr 2266 WIN 44441-3

DAMGO [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly(10)

DADLE [D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH

DSTLE [D-Ser², Leu⁵, Thr⁶]-encefalina H-hyr-D-Ser-Gly-Phe-Key-Thr

DAMEA [D-Ala², Met⁵]-encefalina H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-CONH₂

DPDPE [D-Pen² D-Pen⁵]-encefalina H-Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen

CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Trh-Pen-Trh-NH₂)

U-69593 (5 α , 7 α , 8 β)-(-)-N-metil-N-[7-(1-pirrolidinil)-1-oxaspiro(4.5)-dec-8-il] bencenoacetamida

U 50488 (*trans*-(\pm)-3,4-dicloro-N-metil-N-[2-(pirrolidinil)-ciclohexil]-bencenoacetamida

Modificada de Adler et al., 1990.

Existen tres genes para receptores opioides, los cuales se encuentran localizados en diferentes cromosomas del genoma humano. El gen del receptor μ se encuentra en el cromosoma 6q24-25 (Wang et al., 1994), el del receptor δ en el cromosoma 1p34.3-36.1 (Befort et al. 1994) y el del receptor κ en el cromosoma 8q11.2 (Yasuda et. al. 1994). Sus exones e intrones tienen una organización muy parecida y podrían haberse derivado de un gen antecesor común (Wang et al., 1994). Los receptores opioides se componen de 7 dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G, las cuales, a su vez, activan segundos mensajeros. por ejemplo, la activación de los receptores encefalinergicos inhiben la adenilato cilasa vía proteínas G_i (Ross, 1992). Los receptores opioides tienen entre si una homología del 60 al 67%; la mayor parte de las diferencias se presentan entre las secuencias de aa de los extremos amino y carboxilo terminales, en la cuarta región transmembranal y en la segunda y tercera asas intracelulares (Figura 4). La selectividad por los ligandos y la sensibilidad diferencial a agonistas y antagonistas podría deberse a estas variaciones (Tablas 2 y 4).

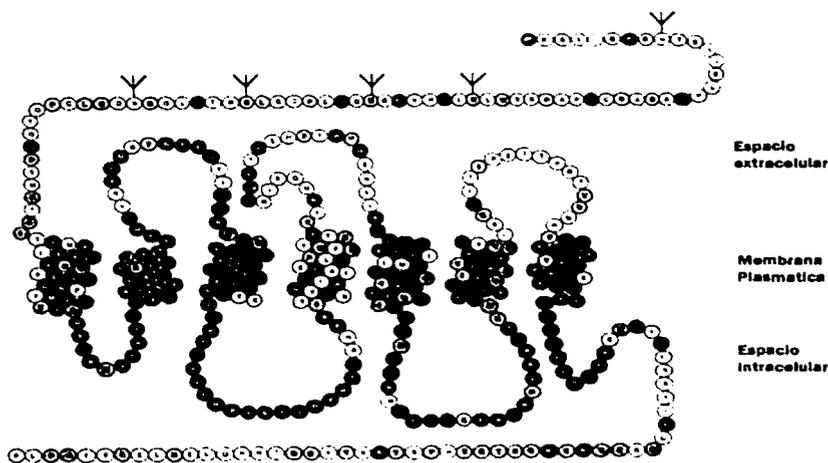


Figura 4. Modelo del receptor opioide μ de la rata. En esta representación esquemática se muestran los 7 dominios transmembranales que conforman al receptor y los extremos amino y carboxilo terminales. Los aa señalados (Y) son los sitios potenciales de glicosilación. Los residuos de aa del receptor μ que están conservados, tanto en el receptor δ como en el κ se muestran en negro, los que están conservados en el receptor δ o en el κ , en gris y aquellos que no están conservados en ninguno de los dos en blanco. (Minami y Satoh, 1995) (ver anexo II)

Distribución de receptores opioides

La distribución de receptores opioides se ha estudiado utilizando ligandos específicos para cada subtipo (Tabla 4) y se ha encontrado que estos receptores están ampliamente distribuidos en el cerebro (Tabla 5). El receptor μ se encuentra en altas concentraciones en regiones tales como la corteza frontal, la amígdala, el hipocampo, el núcleo accumbens, el caudado putamen, el tálamo, los colículos inferior y superior y la sustancia nigra compacta. El receptor se encuentra en bajas concentraciones en el ATV y en algunos núcleos del hipotálamo. En contraste, el receptor δ está restringido a unas cuantas áreas del cerebro, presentándose en altas densidades en el núcleo lateral de la amígdala, el tubérculo olfatorio y el núcleo accumbens, mientras que se detectan bajas densidades en la sustancia nigra reticulata, entre otras. El receptor κ se encuentra en altas densidades en la amígdala, el tubérculo olfatorio, el núcleo accumbens, el área preóptica media y el hipotálamo y en bajas densidades en el hipocampo y la corteza frontal (Tabla 5).

Receptor μ

El receptor μ de rata se clonó en 1993 por varios grupos de investigación (Chen et al., 1993; Fukuda et al., 1993; Thompson et al. 1993; Wang et al. 1993) El receptor μ de humano es codificado por un sólo gen localizado en el cromosoma 6q24-25. Este gen tiene más de 50 KB que contienen intrones separando varios dominios funcionales del receptor (Wang et al., 1994).

Tabla 5. Distribución de receptores y precursores de péptidos opioides en el cerebro de la rata.

Región del SNC	Receptores			Precusores		
	μ	δ	κ	POMC	Pro-Enk	Pro-Din
Telencéfalo						
Corteza frontal	+++	++	+	0	++	+
Corteza piriforme	++	++	++	0	++	+
Corteza entorrinal	++	++	++	0	+++	+
Amígdala						
Núcleo central	0	0	++	++++	++++	++
Núcleo medial	+++	++	++	+++	+++	+
Núcleo lateral	++++	+++	+++	++	+++	+
Formación Hipocampal						
Hipocampo	+++	++	+	0	++	+++
Giro dentado	+++	+	+	0	++	+++
Tubérculo olfatorio	+	+++	+++	0	++	++
Núcleo accumbens	++++	++++	+++	+	+++	++
	(parches)		(ventral)			
Caudado putamen	++++	++++	+++	0	+++	++
	(parches)	(vent-lat)	(vent-med)		(parches)	
Globo pálido	+	+	+	0	++++	+++
Septum medial	+++	+	+	+++	+++	0
Núcleo de la cama de la	+++	++	+++	++++	+++	++
estria terminal						
Área preoptica	+	+	+++	+++	+++	++
Diencéfalo						
Hipotálamo						
Núcleo supraóptico	0	++	++	0	+	+++
Núcleo paraventricular	0	++	++	++++	++++	++++
Núcleo arcuato	0	++	++	++++	+++	++
Núcleo ventromedial	0	+++	+++	+	+++	++
Núcleo dorsomedial	+	+++	+++	++++	++	++
Área hipotalámica lateral	+	++	++	+++	++	+++
Tálamo						
Núcleo paraventricular	0	+++	+++	++++	+++	+
Núcleo central medio	++++	++	++	0	+++	0
Núcleo reuniens	++++	++	++	0	++	0
Habénula media	+++	+++	+++	0	+++	0
Mesencéfalo						
Núcleo interpeduncular (central)	++++	+++	+++	0	+++	0
Substancia nigra						
Pars compacta	+++	0	0	+	++	+
Pars reticulada	++	+	+	0	+	++++
Área tegmental ventral	++	0	+	++	++	+
Substancia gris periacueductal(rostro-ventral)	+	0	++	++++	+++	++
Colículo superior/inferior	++++	+	++	++	+++	+
Núcleo dorsal de rafé	++	0	++	+++	++	+

++++= densidad muy alta; +++= densidad alta; ++= densidad moderada; += densidad baja; 0= densidad indetectable Tomado de Mansour et al., 1988.

Como ya se mencionó, la β -endorfina y ligandos tales como la morfina, la dihidromorfina, el DAMGO, etc. tienen alta afinidad por el receptor μ . Se han caracterizado farmacológicamente dos subtipos de receptores μ , el μ_1 y el μ_2 (Pasternak et al., 1983), para los cuales un mismo ligando tiene distinta afinidad. Por ejemplo, la morfina, tiene alta afinidad por el subtipo μ_1 y menor afinidad por el μ_2 (Pasternak y Wood, 1986; Pasternak, 1988). En general los agonistas para receptor μ tienen efectos, tales como analgesia e inhibición de los hábitos alimenticios y reproductivos, así como diversos efectos neuroendócrinos (Strand, 1999). Sin embargo, a cada subtipo de receptor μ se le han atribuido distintas funciones. El receptor μ_1 parece estar involucrado en mecanismos de analgesia, liberación de prolactina, disminución en la recaptura de acetilcolina y en la inducción de catalepsia, mientras que el receptor μ_2 parece estar participando en mecanismos de depresión respiratoria, disminución de la recaptura de DA y en el retraso del tránsito intestinal que inducen los opioides (Pasternak y Wood, 1986; Pasternak, 1988).

El receptor μ está ampliamente distribuido en el cerebro y en la médula espinal y la densidad de éste varía dependiendo del área cerebral. La estructura en la cual se presentan las densidades más altas de receptor μ es el caudado putamen, en particular en la región de los "parches". En el núcleo centro medial del tálamo y en la sustancia nigra pars compacta los niveles de receptor μ también son muy altos. En cambio, este receptor se encuentra con densidades muy bajas en la matriz del caudado putamen, en el núcleo paraventricular del tálamo y en el ATV (Tablas 5 y 6).

El ARNm del receptor μ está distribuido de manera heterogénea en el cerebro y en la médula espinal, presentándose en niveles altos en el tálamo, el caudado putamen, el *locus coeruleus* y el núcleo del tracto solitario.

Tabla 6. Niveles de receptor μ detectados en el cerebro de rata por autoradiografía.

Área del Cerebro	Región	fmol de [3 H]-DAMGO unido / mg de tejido \pm SEM
Corteza frontal		40.34 \pm 0.56
Corteza prefrontal	Lateral	36.75 \pm 5.35
	Media	57.49 \pm 6.31
Corteza Cingulada		37.94 \pm 3.89
Caudado Putamen	Parches	207.02 \pm 18.01
	Matriz	75.08 \pm 7.94
Núcleo Accumbens	Anterior	92.88 \pm 7.97
	Posterior	68.7 \pm 6.27
	Centro	40.04 \pm 2.86
	Cubierta	95.8 \pm 9.60
Tálamo	Ventro Lateral Posterior	86.11 \pm 1.28
	Dorso Lateral Medio	104.77 \pm 4.74
	Núcleo Reunióms	67.96 \pm 6.91
	Centro Medial	122.22 \pm 1.99
Amígdala	Basolateral	113.65 \pm 8.92
	Lateral	74.52 \pm 5.71
	Posteriomedial Cortical	127.79 \pm 7.78
Hipotálamo		17.25 \pm 1.79
Hipocampo	CA1	48.84 \pm 17.22
	CA2	55.41 \pm 14.85
	CA3	51.34 \pm 17.67
	Giro Dentado	41.54 \pm 8.86
Substantia Nigra	Pars Compacta	129.15 \pm 9.28
	Pars Reticulata	48.79 \pm 5.30
Área Tegmental Ventral		30.58 \pm 10.18

Modificado de Martin et al., 1993. En el artículo original se presentan los datos como nCi/mg de tejido. Para hacer una mejor comparación con los valores obtenidos en este trabajo, los datos de Martin et al. se convirtieron a fmol de [3 H]-DAMGO unido/mg de tejido. La actividad específica del [3 H]-DAMGO es 55.3 μ Ci / mmol (55.3 μ Ci = 1 fmol/mg de tejido).

Efectos del alcohol sobre el sistema opioide endógeno

El etanol y los péptidos opioides comparten numerosas características farmacológicas y producen efectos similares sobre el comportamiento, tanto en animales como en el hombre. Dosis bajas de ambas sustancias producen euforia y activación psicomotora mediante la estimulación del circuito dopaminérgico del tracto medial del cerebro anterior y dosis altas producen sedación (Wise y Bozarth, 1980; Frye y Breese, 1981). Otra característica que comparten el alcohol y los opioides es que son sustancias que pueden autoadministrarse hasta el abuso y eventualmente producir tolerancia y dependencia. Estas evidencias sugieren que la dependencia al alcohol y a los opioides podría estar mediada por un mecanismo común que involucra vías dopaminérgicas de reforzamiento en el cerebro (Wise y Bozarth, 1987).

Se ha sugerido que las propiedades reforzadoras del alcohol podrían deberse, al menos en parte, a que el alcohol activa al sistema opioide endógeno. Esta hipótesis proviene de varias líneas de investigación : 1) del estudio de los efectos de la administración de péptidos opioides exógenos sobre el consumo de alcohol y sobre las respuestas asociadas a los mecanismos de reforzamiento positivo, y 2) de estudios sobre las modificaciones ejercidas por la administración de alcohol sobre los sistemas opioides endógenos. Existen varias evidencias que apoyan esta hipótesis. Zonas del cerebro relacionadas con el reforzamiento positivo de drogas de abuso son ricas en péptidos opioides como las encefalinas y las endorfinas (Gianoulakis, 1993) (Figura 5). Los opiáceos modifican el consumo de alcohol dependiendo de la dosis administrada y de la previa exposición a éstos (Ho et. al. 1976). La naloxona y la naltrexona, antagonistas no específicos de los receptores opioides, disminuyen considerablemente la autoadministración de alcohol en animales experimentales (Froehlich, 1995; Froehlich et al., 1990; Myers et al., 1986; Reid y Hunter, 1984; Ulm et al., 1995) y reducen el número de recaídas en pacientes alcohólicos abstinentes (O'Malley et al., 1992; Volpicelli et al., 1992). La administración de péptidos del tipo de las encefalinas y las endorfinas, así como la de agonistas opiáceos, produce respuestas asociadas a mecanismos de reforzamiento positivo, mientras que la administración de antagonistas bloquea estas respuestas (Amalric et al., 1987; Bozarth y Wise, 1984; Shippenberg et al., 1992; Van Wolfswinkel y Van Ree, 1985). También, se observó que los inhibidores

de la degradación de encefalinas, incrementa el consumo voluntario de alcohol (Blum et al., 1987; George et al., 1991; Hyytiä, 1993).

Algunos estudios indican que existe una predisposición genética a desarrollar alcoholismo y han sugerido que ésta puede estar asociada con una respuesta aumentada del sistema opioide al alcohol (De Waele et al., 1992; Gianoulakis et al., 1989).

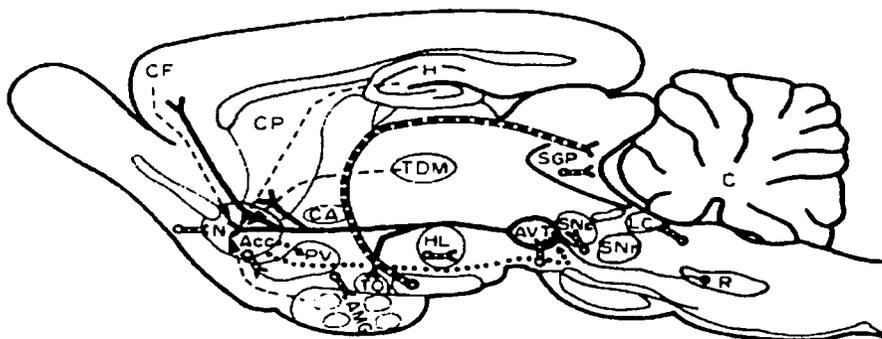


Figura 5. Sistemas de neurotransmisores implicados en las vías de recompensa y reforzamiento positivo de diversas drogas de abuso. El sistema dopaminérgico mesolímbico (———<) se origina en el grupo de células A10 en el área tegmental ventral (TO) y proyecta hacia el núcleo accumbens (N. Acc.), el tubérculo olfatorio (TO), la corteza frontal (CF) y la parte ventral del caudado putamen (CP). Neuronas serotoninérgicas en los núcleos de rafe (R) proyectan hacia el ATV (———<). El sistema opioide endógeno (———<) incluye circuitos encefalinérgicos locales (segmentos cortos) y el circuito endorfinérgico hipotalámico del cerebro medio (segmento largo). (----->) representa las vías aferentes del sistema límbico al N. Acc. y (.....>) las vías eferentes del N. Acc. probablemente implicadas en la recompensa de las drogas de abuso. AMG amígdala, C cerebelo, CA comisura anterior, H hipocampo, HL hipotálamo lateral, LC *locus coeruleus*, PV *pallidum ventral*, SGP sustancia gris periacueductal, SNr *sustantia nigra pars reticulata*, TDM tálamo dorsomedial. Tomado de Méndez y Cruz (1999); modificado de Schulteis y Koob (1994)

El alcohol modifica la transmisión opioidérgica en el cerebro a través de alteraciones en la síntesis y la liberación de péptidos opioides, así como, sobre los receptores opioides. Se conoce muy poco acerca de como el alcohol afecta la síntesis de péptidos opioides; sin embargo, existen algunos estudios realizados en cepas de roedores seleccionadas

genéticamente para preferir o no alcohol. El contenido de ARNm de POMC en la hipófisis y el hipotálamo de cepas de roedores que prefieren alcohol (ratas AA y ratones C57BL/6), es superior al detectado en las cepas correspondientes que no prefieren alcohol (ANA y DBA/2) (De Waele et al., 1992; Gianoulakis et al., 1992). De la misma manera, los niveles de péptidos derivados de POMC también son distintos en las líneas de ratas AA y ANA (Gianoulakis et al., 1992). Además, un tratamiento agudo con alcohol produce un mayor incremento en el contenido de ARNm de POMC en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis de ratas P (que prefieren alcohol) que en las ratas NP (que no lo prefieren) (Froehlich, 1995). Estos resultados sugieren por un lado, que el alcohol puede afectar la síntesis de péptidos opioides como la β -endorfina, y por otro, que existe una sensibilidad aumentada del sistema de endorfina al alcohol en las líneas de roedores que prefieren alcohol, la cual parece estar asociada con una predisposición genética hacia el alto consumo de la sustancia.

Existe poca información respecto al efecto del alcohol sobre la síntesis de encefalinas. Se observó que el contenido de ARNm de Proencefalina es distinto entre las cepas de roedores seleccionadas para preferir o no alcohol. Por ejemplo, el contenido de ARNm de pre-proencefalina (Pre-proenk) en las ratas P es mayor en la parte anterior y menor en la zona posterior del estriado, en comparación con el de las ratas NP. Por otra parte, la exposición al alcohol disminuye los niveles de ARNm de Pre-proenk en la parte anterior del estriado de ambas cepas de ratas y aumenta los niveles en la parte posterior del estriado sólo en las ratas P (Li et al., 1992). Los niveles de ARNm de Pre-proenk, la concentración de Proenk y los niveles de Met-encefalina son menores en el cerebro medio de ratones que prefieren alcohol que en los animales que no lo prefieren. Además, un alto consumo de alcohol en ratones que prefieren alcohol induce una mayor expresión de encefalinas en el estriado y el cerebro medio en comparación con animales de la misma cepa pero que no han sido previamente expuestos a la sustancia (Ng et al., 1996). Así el incremento de los niveles de encefalinas mesolímbicas inducido por alcohol, podría compensar la biosíntesis disminuida de encefalinas en estos animales, lo cual podría estar asociado a una mayor vulnerabilidad al alto consumo de etanol.

Diversos estudios en animales mostraron que la exposición al alcohol modifica el contenido y la liberación de β -endorfina. La administración aguda intragástrica (Patel y

Pohorecky, 1989) o intraperitoneal (Ho y Allen, 1981) de alcohol, así como el tratamiento crónico con la sustancia (Seizinger et al., 1984), aumentan respectivamente, los niveles plasmáticos (Ho y Allen, 1981, Patel y Pohorecky, 1989) e hipotalámicos (Patel y Pohorecky, 1989), así como el contenido y la liberación *in vitro* de β -endorfina en la adenohipófisis (Seizinger et al., 1984). La exposición al alcohol también aumenta la liberación del péptido de células hipotalámicas en cultivo (De Waele y Gianoulakis, 1993; De Waele et al., 1992). Por otra parte, los niveles basales de β -endorfina en el núcleo accumbens de las ratas P son inferiores a los detectados en las ratas NP, pero éstos son semejantes en el hipotálamo de estas cepas de ratas. Sin embargo, la administración crónica de alcohol aumenta los niveles de β -endorfina en el hipotálamo de las ratas P, mientras que éstos permanecen constantes en las NP (De Waele y Gianoulakis, 1994). La liberación de β -endorfina de rebanadas de hipotálamo provenientes de ratones C57BL/6J (que prefieren alcohol) es más alta que la de ratones DBA/2 (que no prefieren alcohol), tanto en condiciones basales como después de la ingesta de alcohol (De Waele et al., 1992). En el caso del hombre, dosis moderadas de alcohol aumentan los niveles plasmáticos de β -endorfina en bebedores sociales con una historia familiar de dependencia de alcohol, mientras que la sustancia no afecta los niveles del péptido en sujetos sin historia familiar de dependencia (Gianoulakis et al., 1990).

Las encefalinas también han sido estudiadas en cepas de ratas seleccionadas genéticamente. Se observó que los niveles de Met⁵-encefalina-Arg⁶Phe⁷ en la hipófisis de ratas AA y ANA son diferentes y que la ingesta crónica de alcohol produce un aumento en los niveles de Met⁵-encefalina-Arg⁶Phe⁷ en el núcleo accumbens y la hipófisis, y una disminución de Leu⁵-encefalina-Arg⁶ en el estriado de las ratas AA (Nylander et al., 1994). Estos datos sugieren que existe una relación entre los niveles endógenos de péptidos opioides y la motivación diferencial para ingerir alcohol entre estas cepas de ratas.

Por otra parte, la liberación de encefalinas en respuesta al alcohol ha sido poco estudiada. Sin embargo, existen estudios que sugieren que la liberación de opioides es un evento importante en las conductas de consumo de alcohol. Se observó que la liberación de dopamina del núcleo accumbens inducida por alcohol es bloqueada por

antagonistas no específicos de receptores opiáceos como la naltrexona (Benjamin et al., 1993), o por antagonistas selectivos del receptor opiáceo δ , como el ICI 174864 (Widdowson y Holman, 1992) y el naltrindol (Acquas et al., 1993). Estos resultados sugieren que el alcohol estimula la liberación de péptidos opioides, los cuales, a su vez, aumentan la liberación de DA a través de la interacción con receptores opioides.

Diversos estudios demostraron que el etanol afecta la unión de ligandos opiáceos a sus receptores. La acción del alcohol es distinta para cada subtipo de receptores opioides dependiendo de la dosis y del tiempo de exposición a la sustancia. La exposición a corto plazo a etanol inhibe la unión del ligando a receptores δ en cerebro de rata y en membranas de células de neuroblastoma N4TG1 (Charness et al., 1983; Hiller et al., 1981). En contraste, la exposición crónica a etanol incrementa la densidad del receptor δ en células NG108-15 (Charness et al., 1983; Charness et al., 1986) y aumenta la afinidad de DADLE en homogenados de estriado de roedores (Pfeiffer et al., 1981). Aunque algunos de estos autores reportaron que el etanol no altera la unión de ligandos al receptor μ (Hiller et al., 1981; Pfeiffer et al., 1981), diversos grupos de investigación han mostrado que el etanol afecta la unión de ligandos específicos a estos receptores dependiendo de las condiciones experimentales. En el estriado de ratón *in vitro*, el etanol exhibe un efecto bifásico sobre la unión de dihidromorfina (DHM) aumentando la unión a bajas concentraciones de etanol y disminuyéndola a altas concentraciones (Tabakoff y Hoffman 1983). El etanol, tanto a bajas como a altas concentraciones, inhibe la unión de DADLE en membranas de estriado, produciendo el doble de la inhibición que se observa con DHM (Tabakoff y Hoffman 1983). Altas concentraciones de etanol *in vitro* disminuyen la unión de DAMGO y DADLE a receptores μ y δ , respectivamente, en la corteza frontal del ratón C57BL/6 (Khatami et al., 1987). En esta región, los receptores μ y δ son igualmente sensibles a la inhibición inducida por etanol. Después de la ingestión crónica de etanol hay una disminución en el número de sitios y en la afinidad de ligando por el receptor μ en la corteza frontal (Khatami et al., 1987) y el estriado de ratón (Hoffman et al., 1982), respectivamente. La afinidad de DHM a receptores opioides se encuentra reducida en la corteza frontal de pacientes alcohólicos (Tabakoff et al., 1985). Por lo tanto, aunque los receptores δ exhiben mayor o igual

sensibilidad al etanol que los receptores μ *in vitro*, la exposición crónica a etanol altera selectivamente al receptor μ en regiones específicas del cerebro.

La administración de naloxona a ratas que prefieren alcohol suprime selectivamente y en forma dependiente de la dosis la ingesta de etanol sin alterar la de agua (Froehlich et al., 1990). A dosis bajas la naloxona es eficaz en antagonizar los receptores μ , con un ligero antagonismo de los receptores δ o κ , mientras que dosis altas antagonizan receptores μ y δ (Chang y Cuatrecasas, 1981, Chang et al., 1979). El hecho de que las dosis altas de naloxona supriman el consumo de alcohol de manera más efectiva que las dosis bajas, sugiere que tanto los receptores μ como los δ juegan un papel importante en el comportamiento de ingesta de alcohol. Aún más, tanto la administración de naltrindol o ICI 174864 (antagonistas selectivos del receptor δ), como la de β -funaltrexamina (un antagonista de acción prolongada selectivo de los receptores μ), suprime la ingesta de alcohol en líneas de ratas que prefieren alcohol (Froehlich, 1995, Froehlich et al., 1990). En contraste, en ratones C57BL/6 la administración de β -funaltrexamina no altera el consumo de alcohol, mientras que el naltrindol si disminuye su ingesta, por lo que en estos animales los receptores δ parecen jugar un papel primordial en las conductas asociadas a la ingesta de alcohol (Lê et al., 1993).

El conjunto de las evidencias anteriormente expuestas sugiere que el sistema opioide endógeno, en particular los sistemas endorfinérgico y encefalinérgico, participan de manera importante, tanto en los efectos reforzadores del alcohol como en las conductas de un alto consumo de la sustancia. Sin embargo, no se conocen los mecanismos mediante los cuales el alcohol afecta la transmisión de péptidos opioides en áreas específicas del cerebro ni el significado biológico de estos cambios en los procesos de reforzamiento y adicción al alcohol. Además, es importante resaltar el hecho de que la mayor parte de la información con que se cuenta proviene de estudios realizados en cepas de roedores seleccionadas genéticamente, por lo que consideramos importante investigar el papel del sistema opioide endógeno en las respuestas *in vivo* al alcohol en animales no seleccionados. Conocer a profundidad estos procesos estudiando los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores implicados, puede contribuir al desarrollo de fármacos capaces de reducir e incluso inhibir el consumo de alcohol. Este

tipo de estudios es relevante en el campo de la salud para el tratamiento terapéutico del alcoholismo, adicción que actualmente también representa un grave problema social.

Planteamiento del problema

La demostración de que los antagonistas selectivos y no-selectivos de los receptores opioides μ y δ bloquean la liberación de DA inducida por etanol en el núcleo accumbens (Benjamin et. al. 1993; Acquas et al., 1993; Di Chiara et al., 1996), sugiere que el alcohol no tiene un efecto directo sobre este proceso en las terminales dopaminérgicas de las vías meso-accumbens, sino a través de péptidos opioides. Así, es posible que el alcohol estimule la liberación de péptidos opioides, los cuales, a su vez, aumentarían la liberación de DA a través de la activación de receptores μ y/o δ en estas vías. Sin embargo, la información con que se cuenta actualmente respecto a los efectos del alcohol sobre el sistema opioide endógeno proviene principalmente de estudios realizados en roedores genéticamente seleccionados para preferir alcohol. Asimismo, no se ha investigado si el etanol modifica la actividad de los receptores opioides μ en áreas que forman parte de las vías de reforzamiento y recompensa en animales no seleccionados genéticamente. Por lo tanto consideramos fundamental investigar si los receptores μ se afectan particularmente por la exposición aguda a etanol.

Hipótesis:

El sistema opioide endógeno podría ser uno de los mediadores de los efectos reforzadores del alcohol. Diversos estudios indican que uno de los componentes que podrían estar involucrados en estas acciones del alcohol es el receptor opioide μ . Si éste es el caso, una dosis aguda de etanol modificará la densidad del receptor μ en las vías implicadas en los mecanismos de reforzamiento de las drogas de abuso. De acuerdo a las evidencias mencionadas observaremos cambios diferenciales dependiendo de la región estudiada y del tiempo transcurrido después de la administración de etanol.

Objetivos:

General:

Investigar el efecto de la administración de una dosis aguda de etanol *in vivo* sobre el receptor μ en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata.

Específicos:

- a) Investigar el efecto de una dosis aguda de etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO al receptor μ en el ATV, el núcleo accumbens y las cortezas frontal y prefrontal a diferentes tiempos después de la administración de la sustancia.
- b) Correlacionar los cambios observados con las concentraciones de etanol en plasma en los tiempos estudiados.

Metodología

Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (250-300 g) que fueron alimentadas con croquetas (Purina Chow) y agua *ad libitum* y mantenidas en un ciclo de luz -oscuridad de 12 horas. Los animales recibieron agua destilada (5 ml/kg) por vía intragástrica durante 7 días con el fin de habituarlas al procedimiento y reducir el estrés. Después de este periodo de habituación, los animales recibieron una dosis aguda de etanol* (2.5 g/kg) (grupo experimental) o agua destilada (grupo control) por vía intragástrica. Los animales fueron sacrificados 30 min, 1, 2 o 4 h después de la administración de etanol o agua e inmediatamente se extrajeron los cerebros, los cuales se congelaron en hielo seco y preservaron a -70° C. A partir de los cerebros se obtuvieron cortes coronales de 20 μ de grosor en un criostato, los cuales se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se guardaron a -70° C. En paralelo, se colectaron muestras de sangre del tronco de cada animal para determinar la concentración de etanol en plasma.

*La dosis administrada a las ratas equivale en humanos a 11 caballitos (de 42 ml) de tequila (de 38°) para un adulto de 56 kg.

Determinación de la concentración de etanol en plasma

De las muestras de sangre colectadas del tronco de los animales se obtuvo el plasma y se desproteinizó utilizando ácido tricloracético. Posteriormente se centrifugó y se

colectó el sobrenadante (plasma). La concentración de etanol se cuantificó por el método de la deshidrogenasa de alcohol (ADH) (Kit Sigma 332B).

El Kit Sigma 332B para determinación enzimática de etanol es un método espectrofotométrico, en el cual, la deshidrogenasa del alcohol (ADH) cataliza la oxidación de alcohol a acetaldehído, con la reducción simultánea de dinucleótido de adenin nicotinamida (NAD) a NADH (Stryer, 1995).



Al término de la reacción de la muestra con la enzima ADH y el cofactor NAD, se midió la absorbancia a 340nm. El aumento en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de etanol en la muestra. La concentración de etanol en las muestras se determinó a partir de una curva estándar de etanol.

Autoradiografía de receptores

Los efectos del etanol sobre los receptores μ se evaluaron por autoradiografía cuantitativa de receptores en cortes coronales seriados de tejido fresco congelado de acuerdo al método descrito por Unterwald et al., (1998). Los cortes fueron llevados gradualmente a temperatura ambiente y se preincubaron en una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, durante 30 min a temperatura ambiente, con el fin de eliminar péptidos opioides presentes en el tejido. Posteriormente, los cortes se incubaron en una solución Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, conteniendo 8nM de [^3H]-[D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina ([^3H]-DAMGO) (agonista selectivo del receptor μ) durante 60 min a 4°C en cámara húmeda (unión total). La unión inespecífica se determinó en una serie paralela de secciones incubadas como ya se describió anteriormente en presencia de 10 μM de naloxona (antagonista no selectivo de receptores opioides). La concentración de [^3H]-DAMGO utilizada en este estudio es aproximadamente 8 veces el valor de la Kd para el ligando; por lo tanto, las densidades resultantes del receptor se aproximan al número de sitios (Unterwald et al., 1998). Los cortes fueron lavados en una solución Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, a 4°C (6 veces durante 20 s) y secados con una corriente ligera de aire frío. Las secciones se colocaron en cassettes de autoradiografía (Amersham) en presencia de estándares de ^3H (ARC) y en aposición con un film sensible a tritio (^3H -Hyperfilm,

Amersham). Se dejó exponer en la obscuridad a temperatura ambiente durante 10 semanas y posteriormente se reveló el film con revelador D-19 y se fijó con "Rapid fixer" (ambos de Kodak).

Cuantificación de los autoradiogramas

Los autoradiogramas se cuantificaron por densitometría utilizando un sistema de análisis de imágenes computarizado (programa IMAGE 1.61, NIH). Se tomaron 10 mediciones de la densidad en 5 diferentes secciones provenientes de cada animal por estructura. La unión específica se obtuvo restando la densidad de la unión inespecífica a la densidad de la unión total. Las estructuras fueron identificadas de acuerdo al atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). Las coordenadas con relación a Bregma son las siguientes: cortezas frontal y prefrontal 5.20 mm a 3.70 mm, núcleo accumbens 2.70 mm a 0.48 mm y ATV -5.20mm a -6.80mm.

Los estándares utilizados para la autoradiografía tienen una concentración conocida de curies / g de plástico (Figura 6). Por lo tanto, utilizando la actividad específica del ligando obtuvimos la equivalencia en fmoles de [³H]-DAMGO unido por mg de tejido equivalente. Con los datos obtenidos de los estándares de tritio se hizo una curva estándar, a la cual se le aplicó una regresión lineal (Figura 7). Los valores en densidad óptica de los tejidos de interés se convirtieron a fmoles de ligando radioactivo unido por mg de tejido equivalente utilizando esta curva.

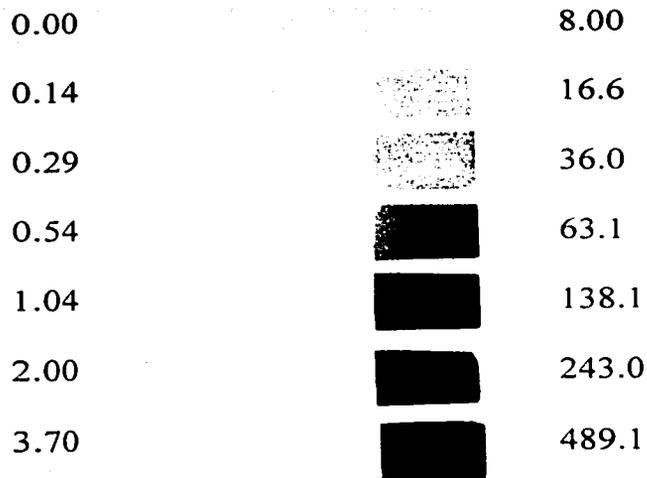


Figura 6. Autoradiografía de una serie de estándares de ^3H con la cual se construye la curva estándar para calcular las fmoles de ligando radioactivo unido/mg de tejido equivalente. Los estándares contienen la concentración indicada de ^3H (μCi / g de plástico).

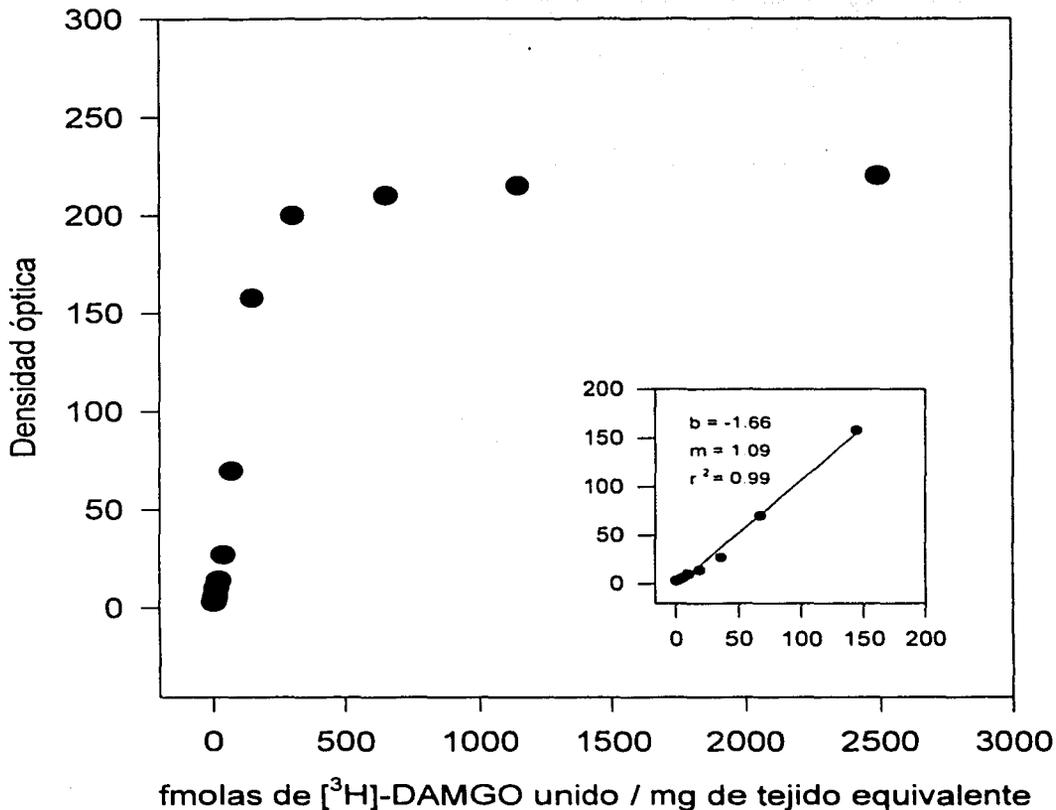


Figura 7. Curva estándar obtenida a partir de la autoradiografía de los estándares de ³H. Los datos representan el promedio de 5 mediciones de la densidad óptica de cada estándar. La gráfica del recuadro muestra la regresión por mínimos cuadrados de la parte lineal de la curva.

Análisis estadísticos

La estadística se llevó a cabo por análisis de varianza (ANOVA) usando el programa SPSS 8.0. Las diferencias significativas fueron investigadas aplicando la prueba post hoc de Tukey H. S. D. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control en ninguna de las estructuras a los tiempos estudiados. Los datos están expresados como la media \pm S.E.M. de 5 ó 6 animales en cada grupo.

Resultados

Concentración de etanol en plasma

Se cuantificaron las concentraciones de alcohol en el plasma de los animales control y tratados con una dosis aguda de etanol. En los animales tratados, encontramos que el nivel más alto de etanol alcanzado en plasma fue de 51.8 mg/dl 30 min después de la administración (Figura 8) y fue decreciendo progresivamente en el tiempo hasta ser indetectable (sensibilidad del ensayo 5.0 mg/dl) 8 h después de la administración de etanol. Los niveles de etanol en plasma se mantuvieron altos durante las primeras 4 h (entre 4 y casi 9 veces el nivel basal) (Figura 8). Como era de esperarse, los niveles de etanol en el plasma de los animales control fueron indetectables en todos los tiempos estudiados (Figura 8). Estos resultados son similares a los reportados previamente por Froehlich (1995) en cepas de roedores que prefieren alcohol.

Durante las primeras 3 h después del tratamiento con etanol, los animales se mantuvieron en grupo y estuvieron relajados (sin llegar a dormirse). La dosis de etanol utilizada en este estudio no produce narcosis. Aunque no se midió la temperatura para evitar estrés en los animales, observamos un efecto hipotérmico producido por el alcohol.

Niveles de etanol en plasma.

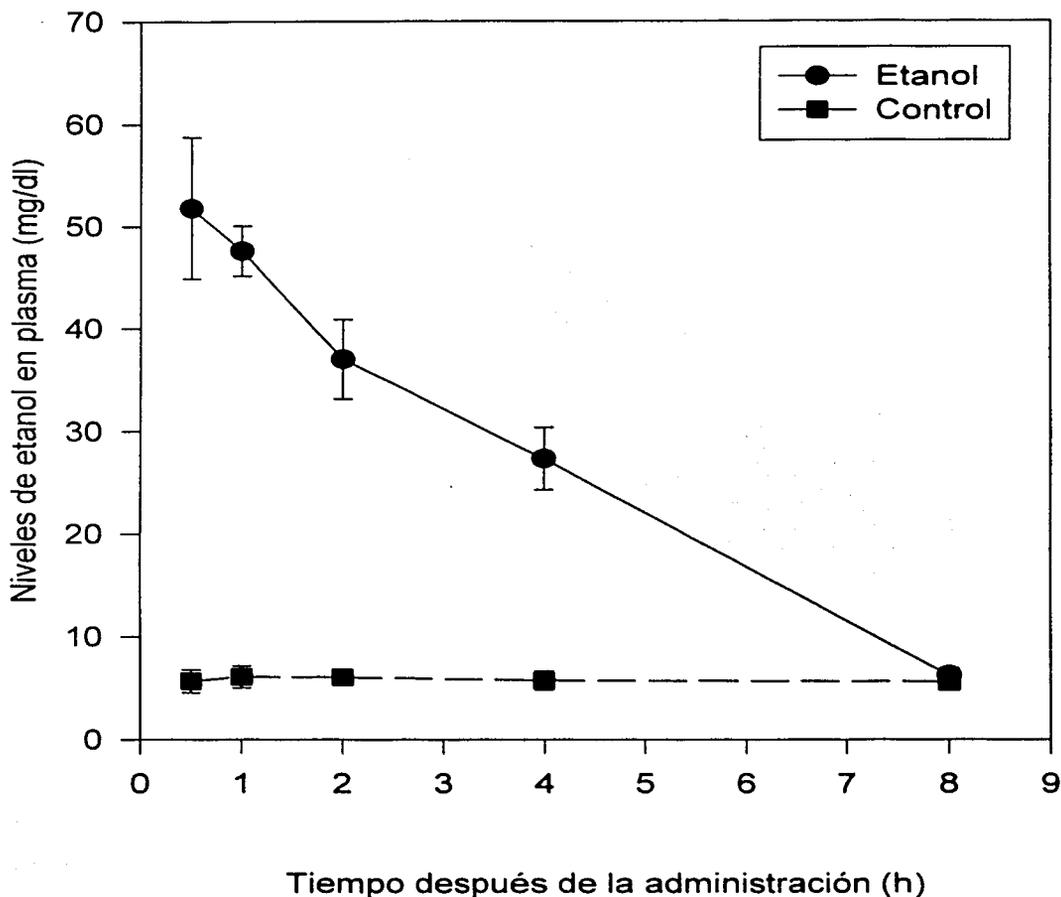


Figura 8. Niveles de alcohol detectados en plasma después de la administración de una dosis aguda de etanol (2.5 g / kg) o agua destilada por vía intragástrica. Las muestras de sangre fueron colectadas 0.5, 1, 2, 4 y 8 h después de la administración y las concentraciones de etanol fueron cuantificadas por el método de la deshidrogenasa del alcohol. Los datos representan el promedio \pm SEM correspondientes a 5 (control) o 6 (etanol) animales.

Efecto de la administración de una dosis aguda de etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata.

La distribución del receptor μ en las áreas cerebrales de las vías meso-accumbens y mesocortical se estudió por autoradiografía cuantitativa de receptores utilizando [³H]-DAMGO como ligando específico. En la figura 9 se muestran las autoradiografías obtenidas de los animales control (A, C, E y G) y de los tratados con etanol (B, D, F y H) al nivel de las cortezas frontal y prefrontal (Figuras 9A y 9B), el núcleo accumbens (Figuras 9C y 9D) y el ATV (Figuras 9E y 9F). En los animales control, las densidades del receptor μ encontradas en estas áreas fueron similares a las previamente reportadas (Mansour et al., 1987; Tempel y Zukin, 1987; Unterwald et al., 1998; Martin et al., 1993). El tratamiento agudo con etanol alteró diferencialmente la unión de [³H]-DAMGO en las cortezas frontal y prefrontal (Figura 9B), la cubierta del núcleo accumbens (Figura 9D) y el ATV (Figura 9F).

En el ATV, encontramos una disminución significativa del 39.7% en la unión de [³H]-DAMGO 30 min después de la administración de una dosis aguda de etanol (Figura 10). Conforme fue pasando el tiempo y los niveles de etanol en sangre fueron disminuyendo, la densidad de receptor μ alcanzó nuevamente los niveles basales.

En las cortezas frontal y prefrontal, la unión de [³H]-DAMGO aumentó significativamente en un 32.2% y 38.1% respectivamente, 1 h después de la administración de etanol (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo control correspondiente en ningún otro tiempo analizado.

En el núcleo accumbens completo (Figura 12 A) y en la región central (Figura 12 B) de esta estructura, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo control correspondiente en ninguno de los tiempos analizados. En contraste una hora después de la administración de etanol encontramos una disminución significativa del 19.3% en la unión de [³H]-DAMGO en la cubierta del núcleo accumbens (Figura 12 C).

CONTROL

TRATADOS CON ETANOL

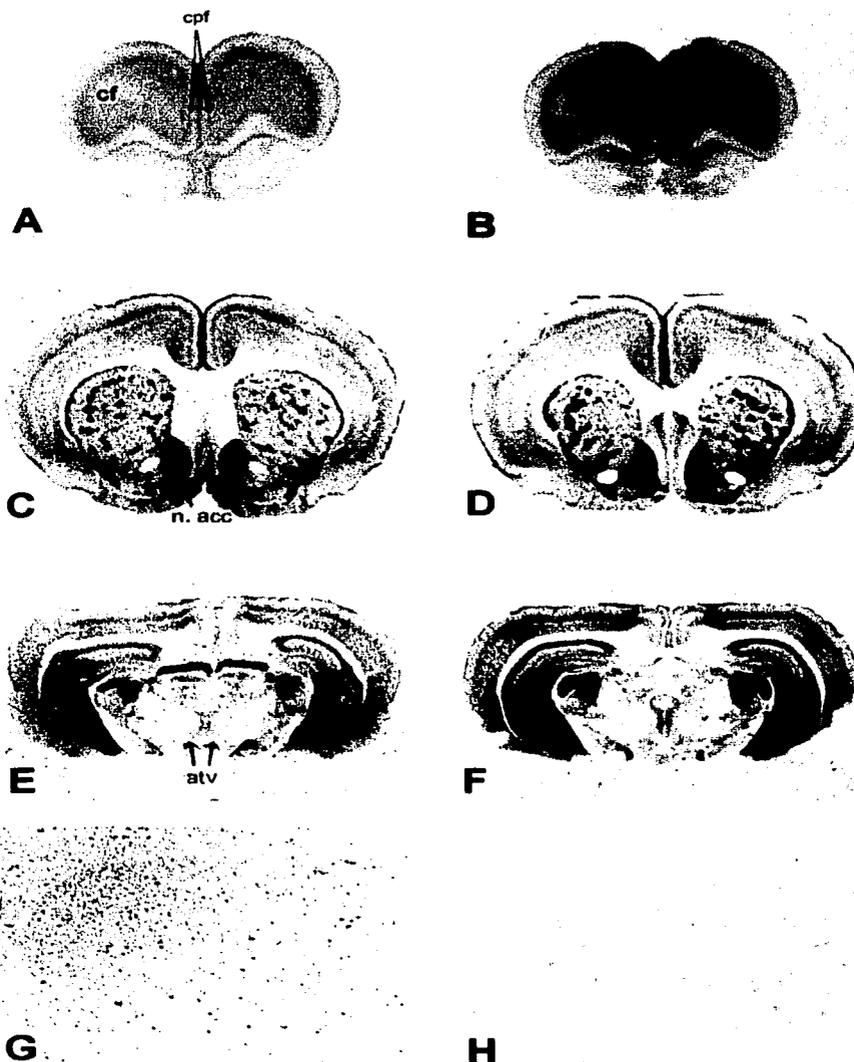


Figura 9. Unión específica de $[^3\text{H}]$ -DAMGO en el cerebro de rata de animales control y tratados con etanol. Los animales recibieron una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg) o agua destilada por vía intragástrica y fueron sacrificados 0.5, 1, 2 y 4 h después de la administración. Las secciones de cerebro fueron incubadas con 8 nM de $[^3\text{H}]$ -DAMGO por 1 h a 4 °C. Las fotografías muestran la unión de $[^3\text{H}]$ -DAMGO en la corteza frontal (cf) y prefrontal (cpf) 2 h después (Figuras A y B), el núcleo accumbens (n. acc.) 1 h después (Figuras C y D) y el área tegmental ventral (ATV) 0.5 h después (Figuras E y F) de la administración. En las figuras G y H se muestra la unión inespecífica a nivel del n. acc. 1 h después de la administración. ce= centro del núcleo accumbens, cu= cubierta del núcleo accumbens.

Unión de [³H]-DAMGO en el área tegmental ventral de la rata.

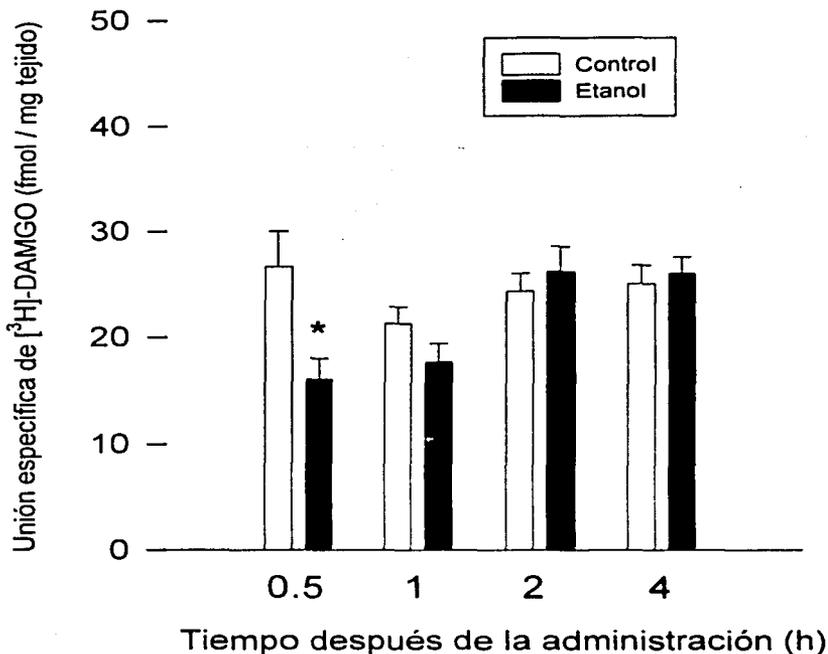


Figura 10. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO en el área tegmental ventral de la rata. El tratamiento de los animales y la autorradiografía de receptores se llevaron a cabo como se describe en la Fig. 9. Los datos representan el promedio \pm SEM correspondientes a 5 (control) o 6 (etanol) animales. * $p < 0.005$

Unión de [³H]-DAMGO en las cortezas frontal y prefrontal de la rata.

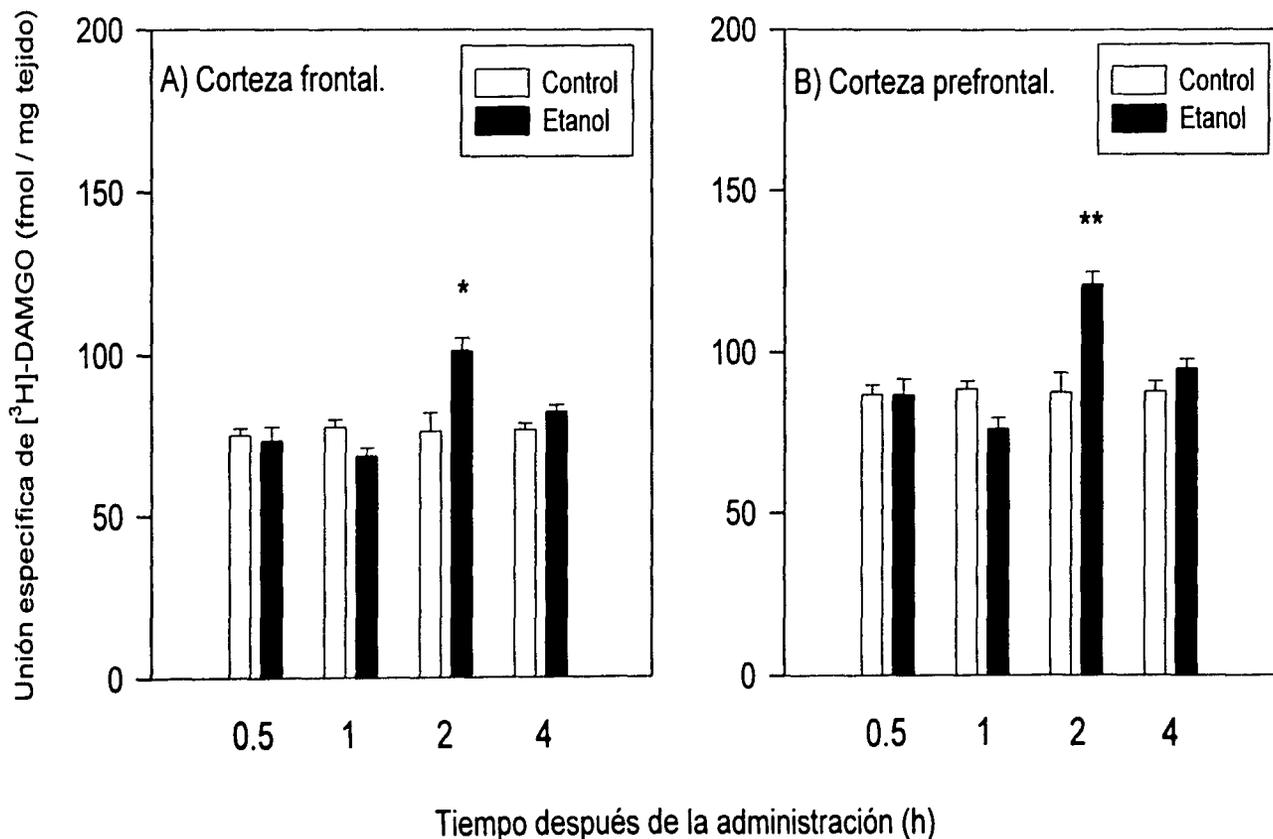


Figura 11. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO en las cortezas frontal y prefrontal de la rata. El tratamiento de los animales y la autorradiografía de receptores se llevaron a cabo como se describe en la Fig. 9. Los datos representan el promedio \pm SEM correspondientes a 5 (control) o 6 (etanol) animales. ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

Unión de [³H]-DAMGO en el núcleo accumbens de la rata.

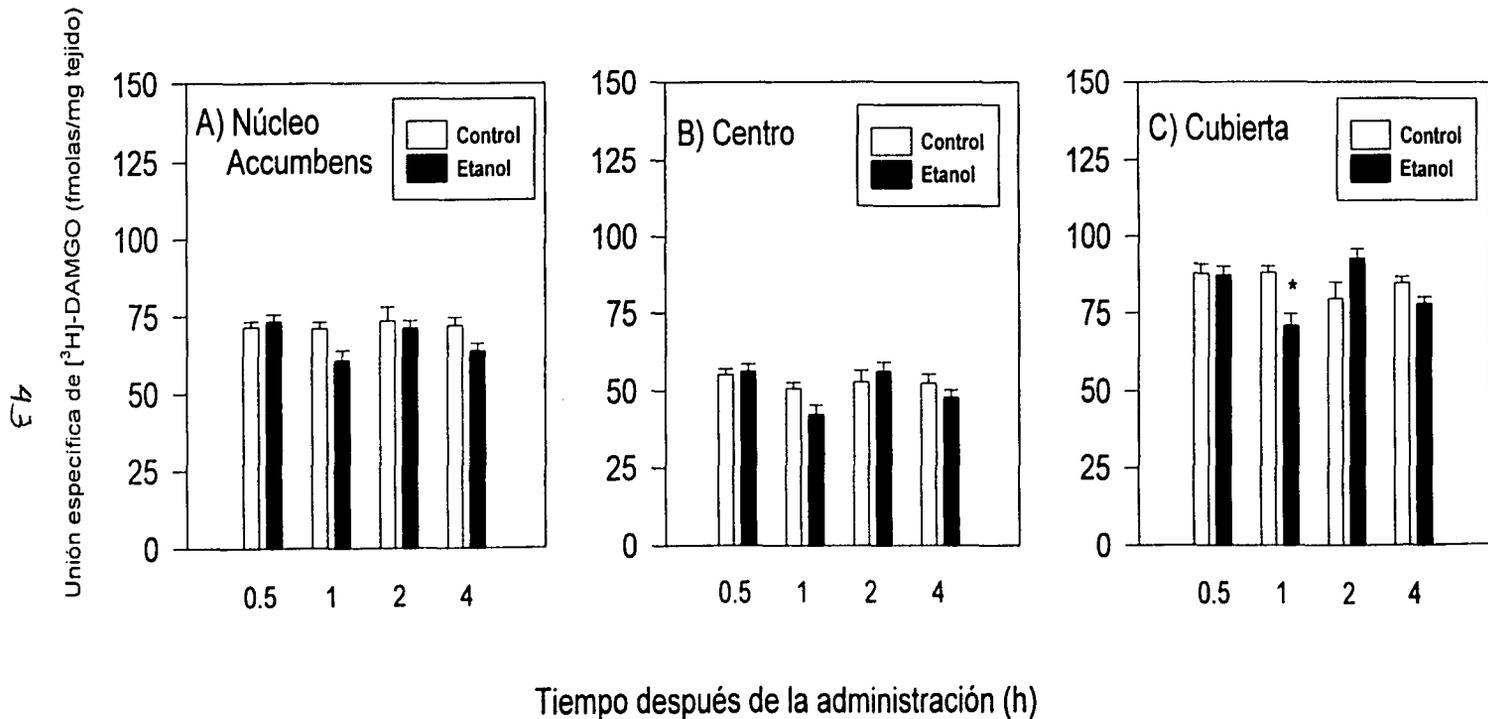


Figura 12. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO en el núcleo accumbens de la rata. El tratamiento de los animales y la autorradiografía de receptores se llevaron a cabo como se describe en la Fig. 9. Los datos representan el promedio \pm SEM correspondientes a 5 (control) o 6 (etanol) animales. Núcleo accumbens completo (A), Centro (B) y Cubierta (C). * $p < 0.01$

En la tabla 7 se muestra un resumen de estos resultados. Encontramos una disminución importante y casi inmediata (30 min.) de la unión del ligando en la región que contiene los somas dopaminérgicos de las vías meso-accumbens y mesocortical, el ATV. En contraste, en las áreas terminales encontramos una pequeña disminución de la unión del ligando en la cubierta del n. acc. y un aumento importante en las cortezas frontal y prefrontal 1 y 2 h después de la administración de etanol, respectivamente.

Tabla 7. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre unión de [³H]-DAMGO en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata.

<i>Región</i>	Tiempo transcurrido después de la administración de etanol (h).			
	<i>0.5</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
ATV	↓ 39.67% ***	-	-	-
Corteza frontal	-	-	↑ 32.25% *	-
Corteza prefrontal	-	-	↑ 38.10% *	-
Núcleo accumbens	-	-	-	-
Centro	-	-	-	-
Cubierta	-	↓ 19.30% **	-	-

- sin efecto.

***p<0.005, **p<0.01 y *p<0.05

Discusión

Evidencias bioquímicas y farmacológicas apoyan la hipótesis de que el sistema opioide endógeno está involucrado de manera importante en la conducta de un consumo alto de alcohol. Se ha postulado al sistema opioide endógeno como posible mediador de los efectos reforzadores del alcohol y también se ha sugerido que los receptores opioides μ participan de manera importante en estos procesos (Froehlich, 1995; Ulm et al., 1995; Herz, 1997). Numerosas líneas de investigación apoyan esta hipótesis. Los estudios en roedores y humanos sugieren que la conducta de un alto consumo de alcohol involucra la existencia de un componente genético que podría estar relacionado con una respuesta

umentada del sistema opioide endógeno al alcohol. Por ejemplo, en estudios realizados en ratones se ha observado que en condiciones basales los niveles hipotalámicos de β -endorfina son mayores en los ratones que prefieren alcohol (C57BL/6) que en aquellos que lo evitan (DBA/2). Después de la exposición a etanol aumentan más los niveles de β -endorfina en los ratones que prefieren alcohol que en aquellos que lo evitan. En humanos se ha observado que los sujetos con alto riesgo de desarrollar alcoholismo (HR) tienen un nivel basal de β -endorfina menor que los sujetos con bajo riesgo (LR). Sin embargo, la exposición a etanol aumenta la liberación de este péptido en mayor proporción en los sujetos HR que en los LR, al igual que en el modelo con roedores (Gianoulakis et al., 1996a; Krishnan-Sarin et al. 1998).

Se ha sugerido que la predisposición de las cepas de roedores seleccionadas genéticamente para preferir alcohol podría explicarse, al menos en parte, por diferencias a nivel de receptores opioides. En este sentido, se ha reportado que las densidades del receptor opioide μ en regiones cerebrales implicadas en las vías de reforzamiento del alcohol (núcleo accumbens, ATV, amígdala y otras regiones del sistema límbico), son mayores en las cepas de roedores que prefieren alcohol que en las cepas correspondientes que no lo prefieren y se ha sugerido una relación directa entre la actividad del receptor μ y la preferencia por alcohol (de Waele et al., 1995; de Waele and Gianoulakis, 1997; Soini et al., 1999; McBride et al., 1998). Evidencias farmacológicas también sustentan la hipótesis de que el receptor μ participa de manera fundamental en la conducta de alto consumo de alcohol. Antagonistas selectivos y no-selectivos de receptores opioides suprimen o reducen considerablemente el consumo voluntario de alcohol en roedores (Froehlich et al., 1990; Froehlich et al., 1991; Krishnan-Sarin et al. 1995), monos (Myers et al., 1986) y humanos (Volpicelli et al., 1992). Por ejemplo, en ratones C57BL/6 el naltrindol (un antagonista específico para el receptor δ), pero no la β -funaltrexamina (un antagonista específico para el receptor μ) reduce el consumo de etanol (Lê et al., 1993). En ratas genéticamente seleccionadas para preferir alcohol, tanto el ICI 174864 (un antagonista específico para receptor δ), como dosis bajas de naloxona (antagonista no selectivo para receptores opioides), reducen el consumo de etanol (Froehlich, et al., 1990). Asimismo, la administración de antagonistas específicos para el receptor μ , tales como el CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Trh-Pen-Trh-NH₂) (Hyytiä, 1993) y la naloxonazina (Hönkanen et al., 1996),

reducen el consumo de etanol en ratas AA. La β -funaltrexamina también disminuye el consumo de alcohol en ratas Wistar (Stromberg et al., 1998) y en cepas de ratas seleccionadas para un alto consumo de etanol (Froehlich, 1995). En pacientes alcohólicos, la naltrexona disminuye el "craving" y el nivel de euforia inducidos por etanol (O'Malley et al., 1992; Volpicelli et al., 1992). Estos datos sugieren que la ocupación de los receptores opioides μ y δ es necesaria para mantener el alto consumo de etanol y que la activación de los sistemas endógenos encefalinérgico y β -endorfinérgico participa de manera importante en el consumo voluntario de etanol.

Datos recientes proporcionan una nueva evidencia de que el receptor μ juega un papel crítico en los mecanismos de reforzamiento del etanol. Los ratones "knockout" del receptor μ no se auto-administran etanol (Roberts et al., 2000); de hecho, el consumo de esta sustancia en estos animales es similar al observado en ratones de la cepa DBA/2J, los cuales son considerados como "evitadores" de alcohol (Belknap et al., 1993; Risinger et al., 1998).

Los resultados del presente estudio son consistentes con las evidencias mencionadas anteriormente y sugieren que el receptor μ participa de manera importante en las acciones reforzadoras del etanol. Nuestros resultados muestran que una sola dosis aguda de etanol *in vivo* afecta diferencialmente la unión de [3 H]-DAMGO en las vías meso-accumbens y mesocortical, las cuales están implicadas en los mecanismos cerebrales de reforzamiento y recompensa. En el ATV, la unión de [3 H]-DAMGO disminuyó significativamente (39.7%) 30 min después de la administración de una dosis aguda de etanol. También encontramos un decremento significativo en la unión de [3 H]-DAMGO en la cubierta del núcleo accumbens 1 h después de la administración de etanol. En contraste, 2 h después de la administración, la unión de [3 H]-DAMGO aumentó significativamente en las cortezas frontal (32.3%) y prefrontal (38.1%). Estos cambios podrían deberse a cambios en la afinidad del ligando por el receptor (K_d) y/o en el número de sitios (B_{max}). Los cambios observados inducidos por etanol parecen ocurrir diferencialmente dependiendo del área cerebral. Esta respuesta diferencial de los subtipos de receptores opioides y, en particular, la diferente sensibilidad de los receptores μ y δ en distintas áreas del cerebro (Khatami et al. 1987) podría estar influenciada por su microambiente, incluyendo el estado físico de los lípidos de la membrana (Chin y Goldstein, 1977; Rubin y Rottenberg, 1983) y/o la naturaleza de las

interacciones de los receptores con "proteínas de acoplamiento" dentro de la membrana. Además, diferencias intrínsecas en los mecanismos mediante los cuales factores endógenos regulan la afinidad de los receptores μ y δ podrían afectar también la respuesta a la sustancia (Hoffman et al., 1984).

Los cambios en los receptores μ podrían producir ciertos efectos específicos del etanol en el Sistema Nervioso Central (SNC), incluyendo posibles alteraciones en la regulación de la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico (Khatami et al. 1987). Así, los cambios que observamos en la unión de [3 H]-DAMGO podrían reflejar repuestas específicas del receptor μ a una dosis aguda de etanol *in vivo* en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata.

Nuestros resultados muestran que los cambios inducidos por etanol sobre la unión de [3 H]-DAMGO en las cortezas frontal y prefrontal, el núcleo accumbens y el ATV correlacionan con altos niveles de etanol en plasma. El nivel más alto de etanol en plasma fue de 51.8 mg/dl 30 min después de la administración de la droga y se mantuvo alto (37.0 mg/dl) 2 h después de la administración. Los cambios observados sobre la unión de [3 H]-DAMGO en respuesta a una dosis aguda de etanol, son consistentes con las acciones reforzadoras del alcohol (Di Chiara et al., 1996; Koob, 1992; Yim et al., 2000).

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Yim y col. (2000). Estos autores observaron que la administración intraperitoneal *in vivo* de una dosis aguda de etanol (2 g/kg) aumenta significativamente la liberación de DA en el núcleo accumbens. Los niveles de etanol se mantienen altos (8 mM) en los dializados obtenidos del núcleo accumbens aún 2 h después de la administración de la droga; en cambio, la liberación de DA regresa a los niveles basales 1.5 h después de la administración. Este estudio muestra que una dosis aguda de etanol tiene efectos reforzadores y que se puede desarrollar tolerancia aguda, lo cual podría ser relevante en los efectos reforzadores del alcohol *in vivo*. Sin embargo, sería de gran interés evaluar los efectos de una sola dosis aguda de etanol a largo plazo (i.e. 8 y 24 h después de la administración) sobre la unión de [3 H]-DAMGO en estas regiones del cerebro, cuando los niveles de etanol en plasma son indetectables.

Los cambios que observamos sobre la unión de [³H]-DAMGO, podrían involucrar mecanismos de regulación positiva y negativa del receptor μ en respuesta a una dosis aguda de etanol *in vivo*. Se ha reportado que los receptores δ son sujetos a regulación homóloga y heteróloga. La exposición de líneas celulares de neuroblastoma a agonistas para el receptor δ induce una regulación negativa del receptor (Thomas y Hoffman, 1986; Law et al., 1982; Law et al., 1983; Belcheva et al., 1992; Charness et al., 1986; Law et al., 1984; Chang et al., 1982; Blanchard et al., 1983). De manera inversa, los antagonistas opiáceos inducen una regulación positiva del receptor δ en líneas celulares neuronales, cultivos neuronales primarios y animales intactos (Charness et al., 1986; Baram y Simantov, 1983; Paden et al., 1987). El etanol también produce una regulación positiva (heteróloga) del receptor δ en células de neuroblastoma (Noronha-Blob et al., 1987).

Los cambios que observamos en este trabajo podrían involucrar mecanismos similares a los arriba mencionados. La disminución que encontramos en la unión de [³H]-DAMGO en el ATV y en la cubierta del núcleo accumbens podría deberse a una regulación negativa del receptor μ inducida por etanol. Esta podría ocurrir por endocitosis mediada por receptores (Law et al., 1984; Blanchard et al., 1983), como se ha sugerido para el receptor δ en respuesta a sus agonistas (Thomas y Hoffman, 1986; Law et al., 1982; Law et al., 1983; Belcheva et al., 1992; Charness et al., 1986). El etanol también altera la liberación de péptidos opioides endógenos, los cuales a su vez, podrían modificar la unión del ligando al receptor. El etanol podría inducir cambios en la biosíntesis de péptidos opioides, lo cual podría llevar a un incremento en los niveles endógenos de péptidos en pozas intracelulares disponibles para ser liberados. Consistente con esta hipótesis, se ha reportado que el etanol induce cambios importantes en los niveles de péptidos opioides y de ARNm de los precursores correspondientes. El incremento que produce una dosis aguda de etanol en los niveles de ARNm POMC en el hipotálamo y en la hipófisis de las ratas P es mayor que en las ratas NP (Froehlich, 1995). El consumo de alcohol también incrementa los niveles de Met⁵-encefalina-Arg⁶Phe⁷ en el núcleo accumbens y en la hipófisis de ratas AA (Nylander, 1994). El alto consumo de alcohol induce una mayor expresión de encefalinas en el estriado y el cerebro medio de ratones que prefieren alcohol, en comparación con aquellos que no han sido expuestos a la

droga (Ng et al., 1996). Además, investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio indican que una dosis aguda de etanol *in vivo* incrementa los niveles de ARNm de Proencefalina (Pro-enk) en la corteza frontal, el núcleo accumbens, el núcleo paraventricular y los cuerpos mamilares del hipotálamo de rata, con diferentes cinéticas (De Gortari et al., 2000). Por lo tanto, en esas regiones del cerebro, un incremento en la expresión de los péptidos opioides en respuesta a etanol podría llevar a un aumento en los niveles del péptido. En estas condiciones, la regulación negativa del receptor μ inducida por etanol podría deberse a una estimulación de la liberación de péptidos opioides endógenos por la droga.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que los antagonistas opiáceos y el etanol producen una regulación positiva de receptores opioides en cerebro y en líneas celulares de neuroblastoma (Lathi y Collins, 1978; Tempel et al., 1984; Yoburn et al., 1985; Charness et al., 1983; Charness et al., 1986; Charness et al., 1993). Nuestros resultados muestran que 2 h después de la administración aguda de etanol *in vivo*, la unión de [³H]-DAMGO se incrementa significativamente en las cortezas frontal y prefrontal. Este efecto podría deberse a una regulación positiva de los receptores μ inducida por etanol, que podría involucrar un aumento en la traducción y/o en el procesamiento del ARNm del receptor, una disminución en la degradación, o un incremento en la disponibilidad de receptores latentes u ocultos en la membrana, tal como se ha sugerido para el receptor δ en respuesta a la exposición crónica a etanol en líneas celulares de neuroblastoma (Belcheva et al., 1992; Charness et al., 1993; Belcheva et al., 1991; Charness et al., 1986; Heron et al., 1981).

Las evidencias bioquímicas y conductuales sugieren que la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico es un evento clave en los mecanismos de reforzamiento y recompensa del alcohol (Bozarth y Wise, 1983; Koob, 1992; Koob y Bloom, 1988; Wise y Bozarth, 1982). Los estudios bioquímicos revelaron que la activación de las vías mesolímbicas de reforzamiento que involucran la liberación de DA, es un proceso crítico en el desarrollo de las conductas adictivas (Herz, 1995). Los estudios de microdiálisis en ratas, muestran que una dosis aguda de etanol aumenta la concentración extracelular de DA en el núcleo accumbens (Di Chiara e Imperato, 1985; Imperato y Di Chiara, 1986; Wozniak et al., 1991; Yoshimoto et al., 1992a; Yoshimoto et al., 1992b).

Otros estudios muestran que el etanol aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas en el ATV, lo cual también lleva a un incremento en la concentración extracelular de DA en el núcleo accumbens (Brodie et al., 1990; Gessa et al., 1985). Por otra parte, se ha reportado la presencia de receptores opioides en el sistema dopaminérgico mesolímbico (Pollard et al., 1977) y varios estudios sugieren que el sistema opioide endógeno está íntimamente relacionado con la transmisión dopaminérgica en esta vía (Herz, 1997; Spanagel et al. 1992). El etanol interfiere con los sistemas endógenos de péptidos opioides (Herz, 1997). Así, estos péptidos podrían participar de manera fundamental como mediadores de las propiedades reforzadoras del alcohol (Fröhlich, 1995; Ulm et al. 1995).

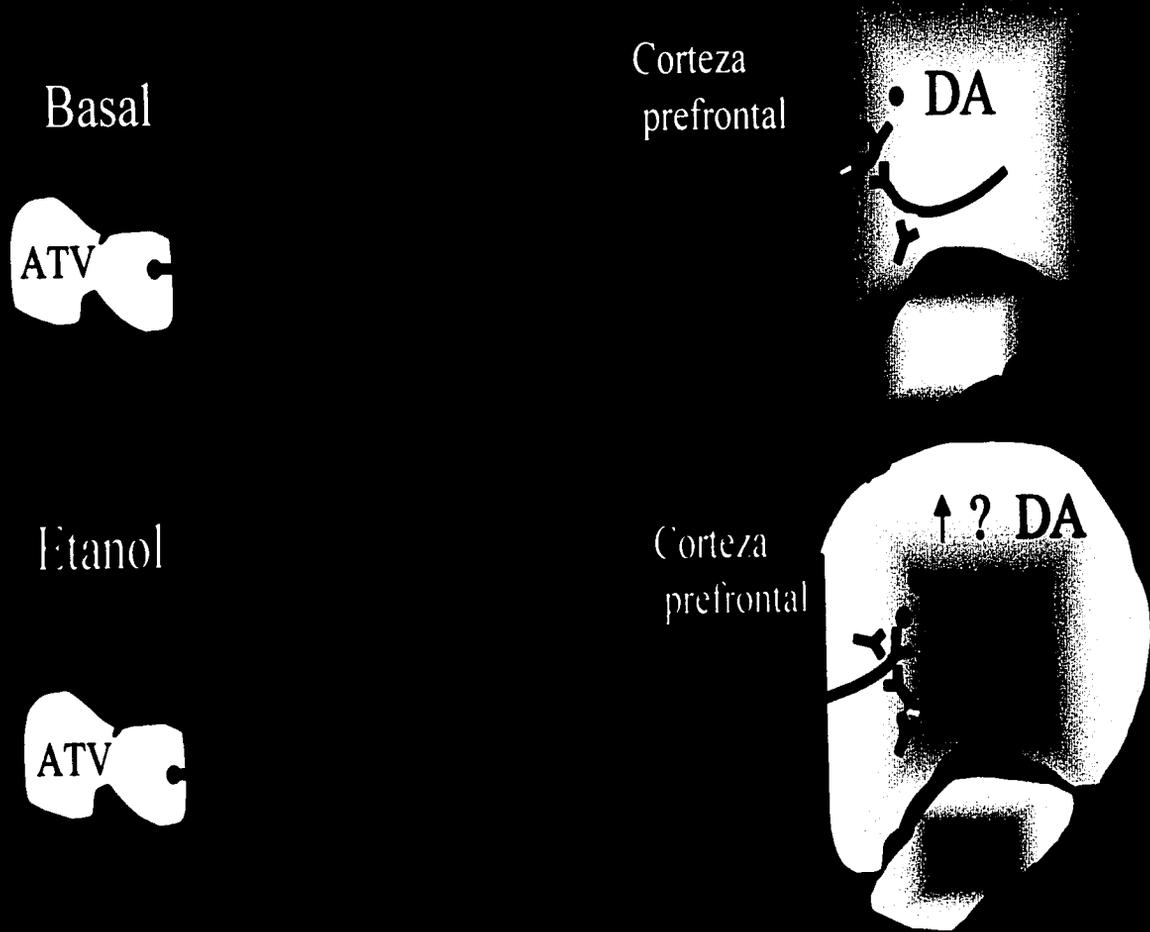
Los receptores μ y δ parecen mediar la liberación de DA inducida por etanol en el núcleo accumbens (Di Chiara et al., 1996), ya que los antagonistas selectivos (naloxonacina, naltrindol) y no-selectivos (naloxona) de los receptores opioides μ y δ bloquean este efecto (Benjamin et al. 1993; Di Chiara et al., 1996; Acquas et al., 1993). Estos datos sugieren que el alcohol probablemente no estimula directamente la liberación de DA en las vías cerebrales de reforzamiento, si no que el etanol podría estimular la liberación de péptidos opioides, los cuales a su vez actuarían sobre los receptores μ y δ estimulando así la liberación de DA (Di Chiara e Imperato, 1985). Estos procesos podrían llevarse a cabo en diferentes regiones dependiendo de los subtipos de receptores opioides involucrados.

Un modelo hipotético propone que el reforzamiento resulta de la activación de receptores opioides μ en el ATV y/o de los receptores δ en el núcleo accumbens (Di Chiara et al., 1996). La administración de DAMGO en el ATV aumenta la liberación de DA, mientras que la de U-69593 (agonista del receptor κ) en el núcleo accumbens disminuye la liberación de DA en esta región (Spanagel et al., 1992). Se ha sugerido que el incremento de éste neurotransmisor en el núcleo accumbens ocurre a través de la activación de los receptores μ lo cual produce una disminución del tono inhibitorio ejercido por neuronas GABAérgicas sobre los cuerpos celulares del ATV (Johnson y North, 1992). Los receptores δ y/o κ podrían actuar en las áreas terminales de las neuronas dopaminérgicas regulando su actividad, (Figura 13 Basal) (Spanagel et al., 1992; Herz, 1995). Según este modelo, un aumento en la transmisión opioidérgica en el

ATV aumentaría la liberación de DA en las áreas terminales de la vía mesocorticolímbica. En el núcleo accumbens los receptores μ y δ podrían participar en la facilitación de la liberación de DA, mientras que el receptor κ , localizado directamente sobre neuronas dopaminérgicas, la inhibiría (Figura 13 Basal). En el caso de las áreas terminales dopaminérgicas en la corteza prefrontal, podría llevarse a cabo un mecanismo similar al propuesto para el núcleo accumbens (Figura 14 Basal).

Nuestros resultados concuerdan con el modelo propuesto. El cambio más importante se observó en el ATV. Como se mencionó, es factible que la disminución en la unión de [3 H]-DAMGO involucre una regulación negativa inducida por alcohol. El etanol podría aumentar la liberación de β -endorfina (u otros ligandos endógenos de alta afinidad por el receptor μ), lo cual podría llevar a una endocitosis mediada por receptores. Si este es el caso, se facilitaría la liberación de DA en el núcleo accumbens (Figura 13 Etanol). Existe también la posibilidad de que el receptor μ se encuentre directamente sobre los somas dopaminérgicos en el ATV; en este caso el decremento de la unión observado podría reflejar una disminución en el número de sitios y/o en la afinidad y por lo tanto una disminución en la transmisión opioidérgica, facilitando así la liberación de DA en las terminales. De igual manera, la reducción de la unión observada en la cubierta del núcleo accumbens podría reflejar una disminución en la transmisión opioidérgica y, dado que los opioides tienen por lo general efectos inhibitorios, este proceso llevaría también a un aumento en la liberación de DA en esta región, si los receptores μ implicados en este proceso se encuentran localizados sobre las terminales dopaminérgicas (Figura 13 Etanol). En contraste, en las cortezas frontal y prefrontal, se observó un aumento importante en la unión del ligando al receptor μ en respuesta al alcohol; por lo tanto, se podrían llevar a cabo mecanismos opuestos a los mencionados (Figura 14 Etanol).

Modelo hipotético de la regulación de la actividad dopaminérgica en la vía mesocortical mediante la activación del sistema opioide por alcohol.



1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612107> (1995) *Journal of Neurochemistry*, 64, 103-111.

2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612107> (1995) *Journal of Neurochemistry*, 64, 103-111.

3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612107> (1995) *Journal of Neurochemistry*, 64, 103-111.

4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612107> (1995) *Journal of Neurochemistry*, 64, 103-111.

Regulación del dopaminérgica en la vía meso-accumbens mediante la activación del sistema opioide en respuesta a etanol.

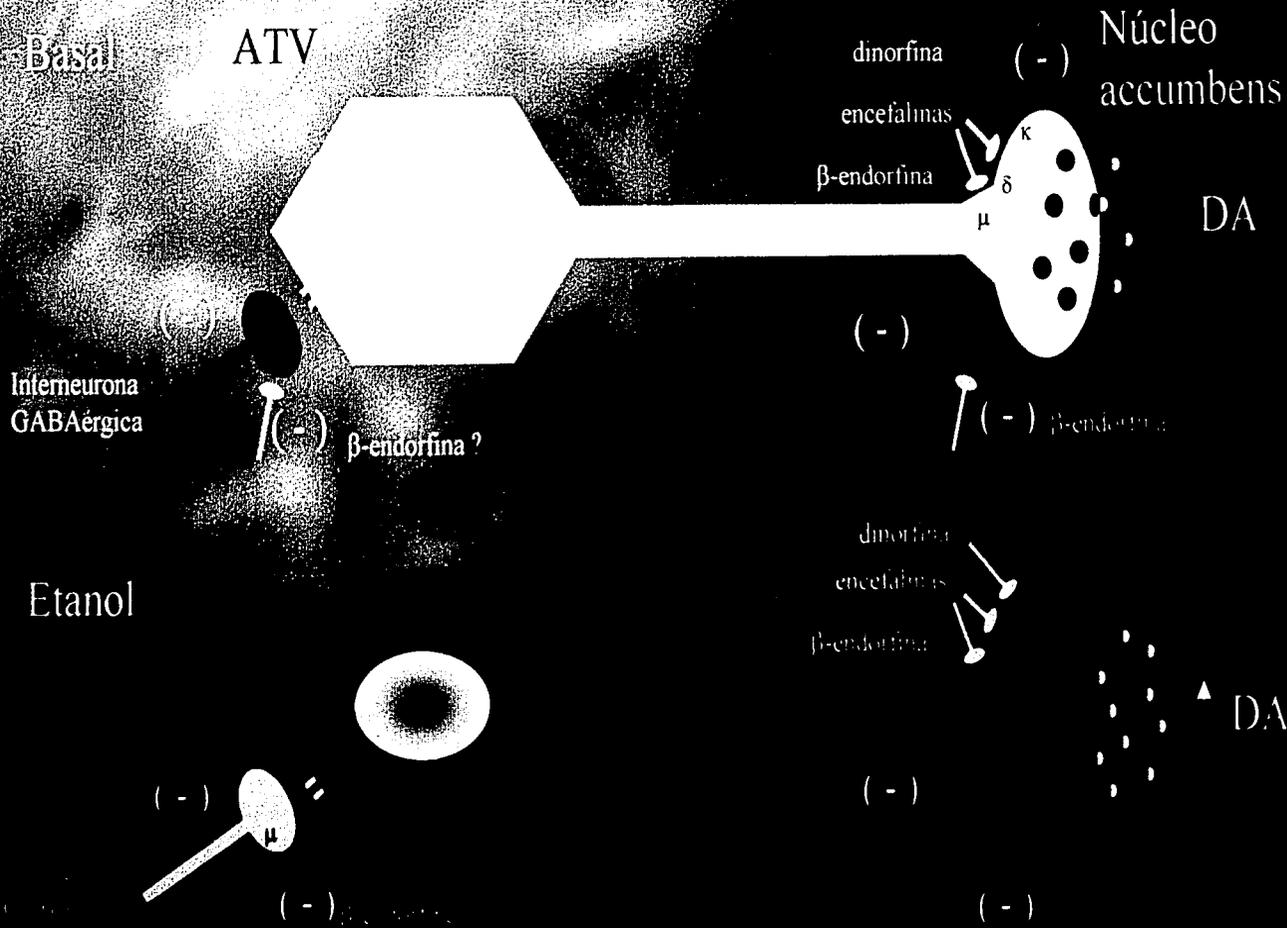


Fig. 1. Efecto de la activación del sistema opioide en la regulación del sistema dopaminérgico en la vía meso-accumbens. El sistema opioide regula la actividad del sistema dopaminérgico en la vía meso-accumbens a través de la activación de los receptores opioide en el núcleo accumbens. El etanol potencia la liberación de DA en el núcleo accumbens a través de la activación del sistema opioide. Los receptores opioide μ , δ y κ están distribuidos en el núcleo accumbens. Los receptores μ y δ están localizados en el núcleo accumbens core, mientras que los receptores κ están localizados en el núcleo accumbens shell. Los receptores μ y δ están inhibidos (-) por β -endorfina, mientras que los receptores κ están inhibidos (-) por dinorfina y encefalinas. El etanol potencia la liberación de DA en el núcleo accumbens a través de la activación del sistema opioide. Los receptores opioide μ , δ y κ están distribuidos en el núcleo accumbens. Los receptores μ y δ están localizados en el núcleo accumbens core, mientras que los receptores κ están localizados en el núcleo accumbens shell. Los receptores μ y δ están inhibidos (-) por β -endorfina, mientras que los receptores κ están inhibidos (-) por dinorfina y encefalinas. El etanol potencia la liberación de DA en el núcleo accumbens a través de la activación del sistema opioide.

Conclusiones y Perspectivas

En resumen, en este trabajo demostramos que una sola dosis aguda de etanol *in vivo* altera diferencialmente la unión de [³H]-DAMGO en las vías meso-accumbens y mesocortical del cerebro de la rata. La respuesta biológica inducida por etanol agudo podría involucrar mecanismos de regulación positiva y negativa del receptor μ . Nuestros resultados sugieren que este receptor podría jugar un papel importante modulando la actividad dopaminérgica de las vías meso-accumbens y mesocortical en respuesta al alcohol. Los receptores μ en el ATV y las cortezas frontal y prefrontal, parece estar involucrado de manera primordial en las respuestas *in vivo* a una dosis aguda de etanol. En contraste, en el núcleo accumbens, tanto los receptores μ como los δ , podrían desempeñar un papel importante en estos procesos.

Para investigaciones futuras, sería necesario determinar si los cambios observados se deben a alteraciones específicas en la afinidad (K_d) y/o en la densidad del receptor μ (B_{max}) en las estructuras cerebrales implicadas en las vías de reforzamiento, así como estudiar el efecto de una dosis aguda de etanol a largo plazo. Por otra parte, consideramos importante investigar que péptidos opioides están participando en estos procesos. Además, nos parece fundamental investigar que eventos de la transmisión de estos péptidos están implicados en los mecanismos de reforzamiento y dependencia del alcohol, así como estudiar la interacción entre los sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores involucrados.

Finalmente, llevar a cabo trabajos de investigación como el presente, nos permitirá llegar a una mejor comprensión de los mecanismos de reforzamiento del alcohol, lo cual contribuiría de manera importante en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento terapéutico del alcoholismo, adicción que actualmente representa un grave problema social y de salud pública.

ANEXO I. Secuencia de diversos péptidos neuroactivos.

Hormona estimulante de melanocitos (α -MSH)	Ac-SYSMEHFRWKPV-NH ₂
Hormona adenocorticotrópica (ACTH)	SYSMEHFRYGKPVGKKRRPVKVYPD GAEDELAEAFPLEF
Péptido parecido a la corticotropina (CLIP)	RPVKVYPNGAEDESAAEAFPLEF
Péptido E	YGGFMRVGRPEWWMRYQKRYGGFL
Péptido F	YGGFMKKMDELYPLEVEEEEANGGEV LGKRYGGFM
Péptido B	FAEPLPSEEEGESYSKEVPEMEKRYG GFMRF
α -Neoendorfina	YGGFLRKYPK

ANEXO II. Los aminoácidos y sus abreviaturas.

Nombre	Codigo de tres letras	Codigo de una letra
Alanina	Ala	A
Cisteina	Cys	C
Acido aspártico	Asp	D
Acido Glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Fenilalanina	Phe	F

Tomado de Alberts et al., 1994.

Bibliografía.

- E. Acquas, M. Meloni, G. Di Chiara. Blockade of δ -opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.* 230 (1993) 239-241.
- B. Adler, R. R. Goodman, G. W. Pasternak. In handbook of chemical neuroanatomy. Ed. A. Björklund, T. Hökfelt, and M. J. Kuhar. Elsevier, Amsterdam, Vol 9 (1990) pp. 359-93.
- H. Akil, S. J. Watson, E. Young, M. E Lewis, H. Khachaturian, J. M. Walker. Endogenous opioids: Biology and function. *Ann. Rev. Neurosc.* 7 (1984) 223-55.
- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. *Molecular Biology of the cell*, 3 era. Edición, Ed. Garland Publishing, (1994), USA.
- M. Amalric, E. J. Cline, J. L. Jr. Martinez, F. E.. Bloom, G . F. Koob: Rewarding properties of β -endorphin as measured by conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)*, 91 (1987) 14-19.
- B. Attali, C. Gouarderes, H. Mazarguil. *Neuropeptides*, 3 (1982) 53-64.
- G. T. Bain, C. Kornetsky: Ethanol oral self-administration and rewarding brain stimulation. *Alcohol*, 6 (1989) 499-503.
- D. Baram, R. Simantov, Enkephalins and opiate antagonists control calmodulin distribution in neuroblastoma-glioma cells, *J. Neurochem.* 40 (1983) 55-63.
- K. Befort, M. G. Mattei, N. Roeckel, B. Kieffer, Chromosomal localization of the delta opioide receptor gene to humane 1p34.3-36.1 and mouse 4D bands by in situ hobrization. *Genomics*, 20 (1994) 143-45.
- M. M. Belcheva, J. Barg, C. Gloeckner, X. M. Gao, D. M. Chuang, C. J. Coscia. Antagonist-induced transient down-regulation of delta-opioid receptors in NG108-15 cells, *Mol. Pharmacol.* 42 (1992) 445-452.
- M. M. Belcheva, J. Barg, R.J. McHale, X.M. Gao, D.M. Chuang, C.J. Coscia, Up-regulation of delta opioid receptors in neuroblastoma hybrid cells: evidence for differences in the mechanisms of action of sodium butyrate and naltrexone, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 (1991) 302-309.
- J. K. Belknap, J. C. Crabbe, E. R. Young. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains, *Psychopharmacology* 112 (1993) 503-510.
- D. Benjamin, E. R. Grant, L. A. Pohorecky. Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats, *Brain Res.* 621 (1993) 137-140.
- S. G. Blanchard, K. J. Chang, P. Cuatrecasas. Characterization of the association of tritiated enkephalin with neuroblastoma cells under conditions optimal for receptor down regulation, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 1092-1097.
- K. Blum, A. H. Briggs, Opioid peptides and genotypic responses to ethanol, *Biogenic Amines* 5 (1988) 527-533.
- K. Blum, A. H. Briggs, M. C. Trachtenberg, L. DeLallo, J. E. Wallace, Enkephalinase inhibition : regulation of ethanol intake in genetically predisposed mice, *Alcohol* 4 (1987) 449-456.
- A. Borsodi, G. Toth: Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann N Y Acad Sci.* May 10:757 (1995) 339-52.
- M. A. Bozarth, R. A. Wise. Neural substrates of opiate reinforcement. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 7 (1983) 569-575.

- M. A. Bozarth, R. A. Wise: Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, 224 (1984) 516-517.
- M. S. Brodie, S. A. Shefner, T. V. Dunwiddie. Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro, *Brain Res.* 508 (1990) 65-69.
- K.-J. Chang, R.W. Eckel, S. G. Blanchard, Opioid peptides induce reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastoma cells, *Nature* 296 (1982) 446-448.
- K.-J. Chang, B. R. Cooper, E. Hazum, P. Cuatrecasas, Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides, *Mol. Pharmacol.* 16 (1979) 91-104.
- K-J Chang, P. Cuatrecasas: Heterogeneity and properties of opiate receptors. *Fed Proc.* 40 (1981) 2729-2734.
- M. E. Charness, A. S. Gordon, I. Diamond, Ethanol modulation of opiate receptors in cultured neural cells, *Science* 222 (1983) 1246-1248.
- M. E. Charness, G. Hu, R. H. Edwards, L. A. Querimit, Ethanol increases delta-opioid receptor gene expression in neuronal cell lines, *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 1119-1127.
- M. E. Charness, L. A. Querimit, I. Diamond, Ethanol increases the expression of functional delta-opioid receptors in the neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 3164-3169.
- Y. Chen, A. Mestek, J. Liu, J. A. Hurlley, L. Yu, Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain, *Mol. Pharmacol.*, 44 (1993) 8-12.
- J. H. Chin, D. B. Goldstein, Drug tolerance in biomembranes: a spin-label study of the effects of ethanol, *Science* 196 (1977) 684-685.
- P. de Gortari, M. Méndez, I. Rodríguez-Keller, L. Pérez-Martínez, P. Joseph-Bravo, Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain, *Neurochem. Int.* 37 (2000) 483-496.
- J.-P. de Waele, C. Gianoulakis, Characterization of the μ and δ opioid receptors in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21 (1997) 754-762.
- J-P de Waele, C Gianoulakis: Effects of single and repeated exposures to ethanol on hypothalamic β -endorphin and CRH release by the C57BL/6 and DBA/2 strains of mice. *Neuroendocrinology*, 57 (1993) 700-709.
- J.-P. de Waele, C. Gianoulakis.: Enhanced activity of the brain β -endorphin system by free-choice ethanol drinking in C57BL/6 but not DBA/2 mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 258 (1994) 119-129.
- J.-P. de Waele, K. Kiianna, C. Gianoulakis, Distribution of the mu and delta opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275 (1995) 518-527.
- J.-P. de Waele, D. N. Papachristou, C. Gianoulakis, The alcohol-preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hypothalamic β -endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding DBA/2 mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261 (1992) 788-794.
- G. Di Chiara, E. Acquas, G. Tanda, Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: The dopamine-opioid link, *Alcohol* 13 (1996) 13-17.
- G. Di Chiara, A. Imperato, Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats, *Eur. J. Pharmacol.* 115 (1985) 131-132.

- J. C. Froehlich, Genetic factors in alcohol self-administration, *J. Clin. Psychiatry* 56 (Suppl 7) (1995) 15-23.
- J. C. Froehlich, J. Harts, L. Lumeng, T.-K. Li, Naloxone attenuates ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference, *Physiol. Biochem. Behav.* 35 (1990) 385-390.
- J. C. Froehlich, M. Zweifel, J. Harts, L. Lumeng, T.-K. Li, Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking, *Psychopharmacology* 103 (1991) 467-472.
- G. D. Frye, G. R. Breese: An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 75 (1981), 372-379.
- K. Fukuda, S. Kato, K. Mori, M. Nishi, H. Takeshima, Primary structures and expression from cDNA of rat opioid receptor from δ and μ subtypes, *FEBS Lett.*, 327 (1993) 311-14.
- G. J. Gatto, J. M. Murphy, W. J. McBride, L. Lumeng, T-K. Li: Intracranial self-administration of ethanol into the ventral tegmental area of alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol ClinExp Res*, 14 (1990) 291.
- S. R. George, L. Roldan, A. Lui, C. A. Naranjo, Endogenous opioids are involved in the genetically determined high preference for ethanol consumption, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15 (1991) 668-672.
- G. L. Gessa, F. Muntoni, M. Collu, L. Vargiu, G. Mereu, Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area, *Brain Res.* 348 (1985) 201-203.
- C. Gianoulakis, Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus, *Eur. J. Pharmacol.*, 180 (1) (1990) 21-9.
- C. Gianoulakis, Endogenous opioids and excessive alcohol consumption, *J Psychiatry Neurosci*, 18 (1993) 148-156.
- C. Gianoulakis, P. Angelogianni, M. Meaney, J. Thavundayil, V. Tawar, Endorphins in individuals with high and low risk for development of alcoholism, Ed.Reid LD, Opioids, Bulimia, and alcohol abuse and alcoholism. Springer Verlag , Nueva York, (1990) 229-47.
- C. Gianoulakis, J. P. De Waele, K. Kiianmaa: Differences in the brain and pituitary beta-endorphin system between the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 16 (1992) 453-459.
- C. Gianoulakis, D. Béliveau, P. Angelogianni, M. Meaney, J. Thavundayil, V. Tawar, M. Dumas, Different pituitary beta-endorphin and adrenal cortisol response to ethanol in individuals with high and low risk for future development of alcoholism, *Life Sci.* 45 (1989) 1097-1109.
- C. Gianoulakis, J.-P. de Waele, J. Thavundayil, Implication of the endogenous opioid system in excessive ethanol consumption, *Alcohol* 13 (1996) 19-23.
- C. Gianoulakis, B. Krishnan, J. Thavundayil, Enhanced sensitivity of pituitary beta-endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism, *Arch. Gen. Psychiatry* 53 (1996) 250-257.
- D. B. Goldstein, J. H. Chin, Interaction of ethanol with biological membranes, *Fed. Proc.* 40 (1981) 2073-2076.
- A. Goldstein, W. Fischli, L. Lowney, M. Hunkapiller, L. Hood, Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 78 (1981) 7219-23.

- J. Gong, X.-W. Li, Z. Lai, J. C. Froehlich, L. Yu, Quantitative comparison of mu opioid receptor mRNA in selected CNS regions of alcohol naive rats selectively bred for high and low alcohol drinking, *Neurosci. Lett.* 227 (1997) 9-12.
- D. Heron, M. Israeli, M. Hershkowitz, D. Samuel, M. Shinitzky, Lipid-induced modulation of opiate receptors in mouse brain membranes, *Eur. J. Pharmacol.* 72 (1981) 361-364.
- A. Herz, Neurobiological principles of drug dependence. Exemplified by opioids and psychostimulants, *Nervenarzt.* 66 (1995) 3-14.
- A. Herz, Endogenous opioid systems and alcohol addiction, *Psychopharmacology* 12 (1997) 99-111.
- A. Herz, Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse?, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76 (1998) 252-258.
- J. M. Hiller, L. M. Angel, E. J. Simon, Multiple opiate receptors: alcohol selectively inhibits binding to delta receptors, *Science* 214 (1981) 468-469.
- P. L. Hoffman, C. T. Chung, B. Tabakoff, Effects of ethanol, temperature and endogenous regulatory factors on the characteristics of striatal opiate receptors, *J. Neurochem.* 43 (1984) 1003-1010.
- P. Hoffman, S. Urwyler, B. Tabakoff, Alterations in opiate receptor function after chronic ethanol exposure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222 (1982) 182-189.
- A. Hönkanen, L. Vilamo, K. Wegelius, M. Sarviharju, P. Hyytiä, E.R. Korpi, Alcohol drinking is reduced by a μ 1- but not by a δ -opiate receptor antagonist in alcohol-preferring rats, *Eur. J. Pharmacol.* 304 (1996) 7-13.
- A. K. S. Ho, J. P. Allen: Alcohol and the opiate receptor : interactions with the endogenous opiates. *Adv Alcohol Subst Abuse.* 1 (1981) 53-75.
- A. K. S. Ho, R. C. A. Chen, J. M. Morrison: Interactions of narcotics, narcotic antagonists, and ethanol during acute, chronic, and withdrawal states. *Ann NY Acad Sci.* 281 (1976) 297-310.
- J. Huges, Insolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine, *Brain Res.* 88 (1975) 295-308.
- J. Huges, H. W. Kosterlitz, B. A. Morgan, L. H. Fothergill, H Morris, Identification of two related pentapeptides from the bobine brain with potent opiate agonist activity, *Nature.* 255 (1975a) 577.
- J. Huges, T. W. Smith, B. A. Morgan, L. H. Fothergill, Purification and properties of enkephalin- thr possible endogenous ligand for the morphine receptor, *Life Sci.* 16 (1975b) 1753-58.
- W A Hunt: Neuroscience Research: How has it contributed to our understanding of alcohol abuse and alcoholism? A Review. *Alcohol Clin Exp Res.* 17 (1993) 1055-1065.
- P. Hyytiä, Involvement of mu-opioid receptors in alcohol drinking by alcohol-preferring AA rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45 (1993) 697-701.
- A. Imperato, G. Di Chiara, Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239 (1986) 219-228.
- K. Iwatsubo, D. H. Clouet, Effects of morphine and haloperidol on electrical activity of rat nigro-striatal neurones, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 202 (1977) 429-436.
- S. Jenab, C. E. Inturrisi, Ethanol and naloxone differentially upregulate delta opioid receptor gene expression in neuroblastoma hybrid (NG108-15) cells, *Mol. Brain Res.* 27 (1994) 95-102.

- S. W. Johnson, R. A. North, Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons, *J. Neurosci.* 12 (1992) 483-488.
- E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, Principles of Neural Science, 3er. Edición, Ed. Appleton y Lance, (1991) USA.
- S. Khatami, P. L. Hoffman, T. Shibuya, B. Salafsky, Selective effects of ethanol on opiate receptor subtypes in brain, *Neuropharmacology* 26 (1987) 1503-1507.
- Y. Kondo, K. Iwatsubo, Diminished responses of nigral dopaminergic neurons to haloperidol and morphine following lesions in the striatum, *Brain Res.* 181 (1980) 237-240.
- G. F. Koob, Neural mechanisms of drug reinforcement, *Ann. NY Acad. Sci.* 654 (1992) 171-191.
- G. F. Koob, F. E. Bloom, Cellular and molecular mechanisms of drug dependence, *Science* 242 (1988) 715-723.
- S. Krishnan-Sarin, S. L. Jing, D. L. Kurtz, M. Zweifel, P. S. Portoghese, T.-K. Li, J. C. Froehlich, The delta opioid receptor antagonist naltrindole attenuates both alcohol and saccharin intake in rats selectively bred for alcohol preference, *Psychopharmacology (Berl.)* 120 (1995) 177-185.
- S. Krishnan-Sarin, G. S. Wand, X.-W. Li, T.-K. Li, P. S. Portoghese, J. C. Froehlich, Effect of mu opioid receptor blockade on alcohol intake in rats bred for high alcohol drinking, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59 (1998) 627-635.
- R. A. Lahti, R. J. Collins, Chronic naloxone results in prolonged increases in opiate binding sites in brain, *Eur. J. Pharmacol.* 51 (1978) 185-186.
- H. Lal, Narcotic dependence, narcotic action and dopamine receptors, *Life Sci.* 17 (1975) 483-496.
- P. Y. Law, D. S. Hom, H. H. Loh, Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. A multiple-step process, *Mol. Pharmacol.* 22 (1982) 1-4.
- P. Y. Law, D. S. Hom, H. H. Loh, Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes, *Mol. Pharmacol.* 24 (1983) 413-424.
- P. Y. Law, D. S. Hom, H. H. Loh, Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 4096-4104.
- A. D. Lê, C. X. Poulos, B. Quan, S. Chow, The effects of selective blockade of delta and mu opiate receptors on ethanol consumption by C57BL/6 mice in a restricted access paradigm, *Brain Res.* 630 (1993) 330-332.
- M. J. Lewis, H. J. June: Neurobehavioral studies of ethanol reward and activation, *Alcohol*, 7 (1990) 213-219.
- C. H. Li, D. Chung, Isolation and structures of a untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands, *Proc Natl Acad Sci USA*, 73 (1976), 1145-48.
- X-W. Li, T-K. Li, J. C. Froehlich: The enkephalinergic system and alcohol preference, *Alcohol Clin Exp Res*, 16 (1992) 359.
- J. Y. Lin, J. T. Pan, Effects of endogenous opiate peptides and their analogs on the activities of hypothalamic arcuate neurons in brain slices from diestrous and ovariectomized rats, *Brain Res. Bull.*, 36 (1994) 225-33.

- A. Mansour, H. Khachaturian, M. E. Lewis, H. Akil, S. J. Watson, Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain, *J. Neurosci.* 7 (1987) 2445-2464.
- T. J. Martin, S. I. Dworkin, J. E. Smith, Effects of Intracerebroventricular Administration of β -Funtaltrexamine on [3 H]DAMGO Binding to rat brain sections, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 267 (1993) 506-14.
- W. R. Martin, C. G. Eades, J. A. Thompson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197 (1976) 517-32.
- W. J. McBride, E. Chernet, D. L. McKinzie, L. Lumeng, T.-K. Li, Quantitative autoradiography of mu-opioid receptor in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats, *Alcohol* 16 (1998) 317-323.
- W. J. McBride, J. M. Murphy, G. J. Gatto, A. D. Levy, L. Lumeng, T-K. Li: Serotonin and dopamine systems regulating alcohol intake. En: H Kalant, J M Khanna, Y Israel (eds). *Advances in Biomedical Alcohol Research*. Pergamon Press, Oxford, (1991) 411-416.
- W. J. McBride, J. M. Murphy, L. Lumeng, T-K. Li: Serotonin, dopamine, and GABA involvement in alcohol drinking of selectively bred rats. *Alcohol*, 7 (1990) 199-205.
- M. Méndez y C. Cruz, Mecanismos cerebrales del reforzamiento del alcohol. II. Bases neuroquímicas: papel del sistema opioide, *Salud Mental* vol.22, año 19. num. 1, (1999) 46-59
- M. Minami, M. Satoh, Review article, Molecular biology of opioid receptors: structures, functions and distributions, *Neuroscience Research*, 23 (1995) 121-45.
- M. Moolten, C Kornetsky: Oral self-administration of ethanol and not experimenter-administered ethanol facilitates re- warding electrical brain stimulation. *Alcohol*, 7 (1990) 221-225.
- R. D. Myers, S. Borg, R. Mossberg, Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey, *Alcohol* 3 (1986) 383-388.
- G. Y. K. Ng, B. F. O'Dowd, S. R. George, Genotypic differences in mesolimbic enkephalin gene expression in DBA/2J and C57/6J inbred mice, *Eur. J. Pharmacol.* 311 (1996) 45-52.
- L. Noronha-Blob, V. C. Lowe, W. J. Kinnier, D. C. U'Prichard, Heterologous up-regulation of Ni-coupled receptors in cultured neural hybrid cells by a transferable factor, whose expression is inhibited in a cyclic AMP-dependent, cell-specific manner, *Mol. Pharmacol.* 32 (1987) 669-677.
- I. Nylander, P. Hyytiä, O. Forsander, L. Terenius, Differences between alcohol-preferring (AA) and alcohol-avoiding (ANA) rats in the prodynorphin and proenkephalin systems, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18 (1994) 1272-1279.
- J Olds, P Milner: Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, 47 (1954) 419-427
- S. O'Malley, A.J. Jaffe, G. Chang, R. S. Schottenfeld, R. E. Meyer, B. Rounsaville, Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence, *Arch. Gen. Psychiatry* 49 (1992) 881-887.
- C. M. Paden, S. Krall, W. C. Lynch, Heterogeneous distribution and upregulation of mu, delta and kappa opioid receptors in the amygdala, *Brain Res.* 418 (1987) 349-355. G. W. Pasternak, A. R. Gintzler, R. A. Houghten, *Life Sci.* 33 suppl.1 (1983) 167-73.
- G. W. Pasternak, Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain, *J. Am. Med. Assoc.*, 259 (1988) 1362-67.

- G. W. Pasternak, P. J. Woog, Multiple mu-opiate receptors. *Life Sci.*, 38 (1986) 1889-98.
- V. A. Patel, L. A. Pohorecky: Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. *Alcohol*, 6 (1989) 59-63.
- G. Paxinos, C. Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition, Academic Press, San Diego, 1998.
- C. B. Pert, G. Pasternak, S. H. Snyder, Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* 182 (1973) 1359-1361.
- C. B. Pert, S. H. Snyder, Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, (1973) 1011-14.
- C. B. Pert, S. H. Snyder, Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Mol. Pharmacol.* 10 (1974) 868-879.
- A. Pfeiffer, B. R. Seizinger, A. Herz, Chronic ethanol imbibition interferes with δ -, but not with μ -opiate receptors. *Neuropharmacology* 20 (1981) 1229-1232.
- T. J. Phillips, K. J. Brown, S. Burkhart-Kasch, C. D. Wenger, M. A. Kelly, M. Rubinstein, D. K. Grandy, M. J. Low, Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking D_2 receptors. *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 610-615.
- R. O. Pihl, J. B. Peterson: Etiology of drug addiction. *Annu Rev Addict Res Treat*, 2, 1992.
- H. Pollard, C. Llorens, J. J. Bonnet, J. Costentin, J. C. Schwartz, Opiate receptors on mesolimbic dopaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 7 (1977) 295-299.
- P. S. Portoghese, M. Sultana, H. Nagase, A. E. Takemori, A highly selective $\delta 1$ opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 218, (1992) 195-6.
- D. D. Rasmussen, C. A. Bryant, B. M. Boldt, E. A. Colasurdo, N. Levin, Ch. W. Wilkinson, Acute alcohol effects on opioimelacortinerbic regulation. *Alcohol Clin Exp Res*, 22 (1998) 789-801.
- K. Rattan, G. A. Tejwani, Effect of chronic treatment with morphine, midazolam and both together on dynorphin (1-13) levels in the rat. *Brain Res.* 754 (1997) 239-44.
- K. Raynor, H. Kong, Y. Chen, K. Yasuda, L. Yu, G. I. Bell, T. Reisine, Pharmacological characterization of the cloned μ -, δ -, and κ -opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 45 (1994) 330-334.
- L. D. Reid, G. A. Hunter, Morphine and naloxone modulate intake of ethanol. *Alcohol*, 1 (1984) 33-37.
- L. D. Reid (Ed.), *Opioids, bulimia, and alcohol abuse and alcoholism*. Springer-Verlag, New York, 1990, pp. 229-246.
- F. O. Risinger, M. M. Brown, A. M. Doan, R. A. Oakes, Mouse strain differences in oral operant ethanol reinforcement under continuous access conditions. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22 (1998) 677-684.
- A. J. Roberts, J. S. McDonald, C. J. Heyser, B. L. Kieffer, H. W. D. Matthes, G. F. Koob, L. H. Gold, μ -opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 1002-1008.
- J. S. Rodefer, U. C. Campbell, K. P. Cosgrove, M. E. Carroll, Naltrexone pretreatment decreases the reinforcing effectiveness of ethanol and saccharin but not PCP or food under concurrent progressive-ratio schedules in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* 141 (1999) 436-446.
- E. M. Ross, G proteins and receptors in neuronal signalling. In: *An Introduction to Molecular Neurobiology*. Ed. Z. W. Hall. Sunderland, Mass., Sinauer, (1992) 181-206.

- E. Rubin, H. Rottenberg, Ethanol and biological membranes injury and adaptation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (Suppl. 1) (1983) 7-13.
- G. Schulteis, G. Koob: Dark side of drug dependence. *Nature*, 371 (1994) 108-109.
- B. R. Seizinger, K. Bovermann, V. Höllt, A. Herz, Enhanced activity of the β -endorphinergic system in the anterior and neurointermediate lobe of the rat pituitary after chronic treatment with ethanol liquid diet. *J Pharmacol Exp Ther*, 230 (1984) 455-461.
- J. C. Schwartz, B. Malfroy y S. de la Baume, Biological inactivation of enkephalins and role dipeptidyl carboxipeptidase ("enkephalinase"). *Life Sci* 29 (17) (1981), 1715-40.
- T. S. Shippenberg, A. Herz, R. Spanagel, R. Bals-Kubik, C. Stein: Conditioning of opioid reinforcement: neuroanatomical and neurochemical substrates. *Ann NY Acad Sci*, 654 (1992) 347-356.
- G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, M. D. Uhler, Basic neurochemistry, Lippincott-Raven, 6ª edición, 1999.
- E. J. Simon, J. M. Hiller, I. Edelman. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^3H -etorphine to rat brain homogenate, *Proc. Natl. Acad. Sci: U.S.A.* 70 (1973) 1947-1949.
- B. F. Skinner, *Science and Human Behavior*, McMillan, Nueva York, 1953.
- S. L. Soini, A. Honkanen, P. Hyytiä, E. R. Korpi, [^3H]Ethylketazocine binding to brain opioid receptor subtypes in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats, *Alcohol* 18 (1999) 27-34.
- R. Spanagel, A. Herz, T.S. Shippenberg, Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 2046-2050.
- F. L. Strand, *Neuropeptides*, Massachusetts Institute of technology, (1999).
- M. F. Stromberg, M. Casale, L. Volpicelli, J. R. Volpicelli, C. P. O'Brien, A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and β -funaltrexamine on ethanol consumption in the rat, *Alcohol* 15 (1998) 281-289.
- L. Stryer, *Biochemistry*, 4a ed. 1995.
- B. Tabakoff, P. L. Hoffman, Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.* 32 (1983) 197-204.
- B. Tabakoff, P. L. Hoffman, P. Valverius, S. Borg, J. M. Lee, R. Jaffe, D. U'Prichard, F. DeLeon-Jones, Characteristics of receptors and enzymes in brains of human alcoholics, *Alcohol* 2 (1985) 419-423.
- G. A. Tejwani, A. K. Rattan, Met-enkephalin alteration in the rat during chronic injection of morphine and/or midazolam, *Brain Res.* 775 (1997) 119-26.
- L. Terenius, Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain, *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 33 (1973) 377-84.
- A. Tempel, E. L. Gardner, R. S. Zukin, Visualization of opiate receptor upregulation by light microscopy autoradiography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 3893-3897.
- A. Tempel, R. S. Zukin, Neuroanatomical patterns of the μ , δ , and κ opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4308-4312.
- J. M. Thomas, B. B. Hoffman, Agonist-induced down-regulation of muscarinic cholinergic and α_2 -adrenergic receptors after inactivation of Ni by pertussis toxin, *Endocrinology* 119 (1986) 1305-1314.

- R. C. Thompson, A. Mansour, H. Akil, S. J. Watson, Cloning and pharmacological characterization of a rat μ opioid receptor. *Neuron*, 11 (1993) 903-13.
- R. R. Ulm, J. R. Volpicelli, L. A. Volpicelli, Opiates and alcohol self-administration in animals. *J. Clin. Psychiatry* 56 (Suppl 7) (1995) 5-14.
- E. M. Unterwald, B. Antón, T. To, H. Lam, C. J. Evans, Quantitative immunolocalization of mu opioid receptors: Regulation by naltrexone. *Neuroscience* 85 (1998) 897-905.
- L. Van Wolfswinkel, J. M. Van Ree, Differential effect of naloxone on food and self-stimulation rewarded acquisition of a behavioral response pattern. *Pharmacol Biochem Behav.* 23 (1985) 199-202.
- J. R. Volpicelli, A. I. Alterman, M. Hayashida, C. P. O'Brien, Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* 49 (1992) 876-880.
- J. B. Wang, Y. Imai, C. M. Eppler, P. Gregor, C. E. Spivak, G. R. Uhl, μ Opiate receptor: cDNA cloning and expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 10230-34.
- J. B. Wang, P. S. Johnson, A. M. Persico, Human mu-opiate receptor-cDNA and genomic clones, pharmacological characterization and chromosomal assignment, *FEBS Lett.* 338 (1994) 217-22.
- J. M. Wehner, B. J. Bowers, Use of transgenics, null mutants, and antisense approaches to study ethanol's actions. *Alcohol Clin Exp Res*, 19 (1995) 811-20.
- J. D. White, K. D. Stewart, J. E. Krause, J. F. Mc. Kelvy, Biochemistry of peptide secreting neuron. *Physiol. Rev.* 65(3) (1985) 553-606.
- R. A. Wise, M. A. Bozarth, Action of drugs of abuse on brain reward systems: an update with specific attention to opiates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17 (1982) 239-243.
- R. A. Wise, Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (supl. 1) (1980) 213-23.
- R. A. Wise, M. A. Bozarth: A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev*, 94 (1987) 469-492.
- P. S. Widdowson, R. B. Holman, Ethanol-induced increase in endogenous dopamine release may involve endogenous opiates. *J. Neurochem.* 59 (1992) 157-163.
- K. M. Wozniak, A. Pert, A. Mele, M. Linnoila, Focal application of alcohols elevates extracellular dopamine in rat brain : A microdialysis study, *Brain Res.* 540 (1991) 31-40.
- K. Yasuda, R. 3rd Espinosa, J. Takeda, M. M. Le Beau, G. I. Bell, Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2., *Genomics*, Feb;19(3) (1994) 596-7.
- H. J. Yim, D. L. Robinson, M. L. White, J. N. Jaworski, P. K. Randall, F. E. Lancaster, R. A. Gonzales, Dissociation between the time course of ethanol and extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens after a single intraperitoneal injection. *24 N°6* (2000) 781-88.
- B. C. Yoburn, R. R. Goodman, A. H. Cohen, G. W. Pasternak, C. E. Inturrisi, Increased analgesic potency of morphine and increased brain opioid binding sites in the rat following chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 36 (1985) 2325-2332.
- K. Yoshimoto, W. J. McBride, L. Lumeng, T.-K. Li, Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16 (1992a) 781-785.

- K. Yoshimoto, W. J. McBride, L. Lumeng, T.-K. Li, Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens, *Alcohol* 9 (1992b) 17-22.
- M. J. Zigmond, F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts, L. R. Squire, *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, London, (1999) 1267,1270.