

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**PARTICIPACIÓN DE LA β -ENDORFINA EN LAS
RESPUESTAS IN VIVO A LOS TRATAMIENTOS
AGUDO Y CRÓNICO CON ETANOL EN EL SISTEMA
DOPAMINÉRGICO MESOCORTICOLIMBÍCO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. MARIANA LERICHE VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

Para Azul quien vino a colmar mi vida de amor y alegría.

Para mis maravillosos padres Jorge y Ana.



Agradezco a mi tutora la Dra. Milagros Méndez, al Dr. Jean-Louis Charli y al Dr. Francisco Pellicer por haber conformado mi comité tutorial y por sus valiosos comentarios a lo largo de mis estudios de doctorado y los relacionados a la presente tesis. Mi agradecimiento también a todos los investigadores e Instituciones que me permitieron llevar a cabo este proyecto de investigación: Dra. Méndez en el Instituto Nacional de Psiquiatría, Dra. Anne Berod en la Univesité Claude Bernard y a los Drs. Jean-Louis Charli, Patricia Joseph y Antonieta Cote en el Instituto de Biotecnología, UNAM. También agradezco al CONACYT, al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM, a ECOS Francia, al ANUIES y al Instituto Nacional de Psiquiatría por haber invertido en mi educación. Agradezco al jurado designado para evaluar el presente trabajo por sus acertadas sugerencias para mejorarlo: Dr. José Alonso Fernández Guasti, Dr. Gabriel Roldán Roldán, Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo y Dr. Rolando Hernández Muñoz.

Agradecimientos a todas esas personas extraordinarias que por genes o por azar han estado presentes en mi vida.

A mis padres por todo y por siempre. Gracias

A Azul por darme la oportunidad de sentir la inmensa felicidad y gratitud del amor incondicional.

A Nicolas pour être un homme formidable, merci pour tout ton amour, pour ton inépuisable générosité et sur tout pour partager ta vie avec moi.

A mis abuelos, Ángela y Pablo que siempre me cuidaron como si fuera su hija la más consentida.

A Renato que tuvo el coraje y la perseverancia suficientes para completar mis tramites del doctorado! Eres el mejor, hermano!

A ma belle mère Maddy Vautrelle pour m'aider et me soutenir comme sa propre fille pendant la période d'écriture de mon dernier article et ma thèse. Je te remercie pour ta grande bonté et generosité.

A Aida y Joanna que siempre han estado al pendiente de mí.

A la Dr. Anne Bérod qui m'a appris le double marquage (Fos + GAD) en même temps qu'elle a fait grandir mon amour pour la science. Mes remerciements les plus sincères.

A la Dra. Antonieta Cote con todo mi respeto y admiración por su profesionalismo y rectitud.

A mis Amigos insustituibles, inagotables, geniales, estupendos, únicos: **muchas gracias.**

A los 6X : Alberto, Pancho, Lalo, Karina y Roberto por todo lo que hemos compartido...y lo que nos falta. "Vivimos juntos y moriremos juntos"

A Elba, Angeles, Dr.Luis Rosales León y Dr. Rodrigo Arreola Alemón gracias por soportarme y acompañarme en esta vida.

A Pina, Ginés, Iván, Paty y Karina Cortez, gracias por los domingos de basquet, por las reuniones, los bailes, los mariachis...

A los buenos amigos del Instituto que siempre tuvieron tiempo para escucharme y ayudarme: Irais, Eduardo, René, Silvia, José, Marce, Juan Carlos, Dr. Assai, Ana Julia, Fabiola, Gil, David, Ediht, Maura.

Índice

Resumen.	6
Lista de publicaciones.	8
Introducción.	9
I. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.	11
1.1 Descripción anatómica.	11
1.2. El circuito de recompensa y las drogas de abuso.	12
1.3. Sustratos neurales del alcohol.	14
II. Péptidos opioides.	15
2.1 Familias de péptidos opioides.	15
2.2 Biosíntesis y procesamiento de los péptidos opioides.	17
2.3 Distribución de los péptidos opioides.	21
2.4. Liberación y degradación.	24
2.5. Receptores a opioides.	25
2.6 Distribución de receptores a opioides.	29
2.7 Funciones fisiológicas.	31
2.8 Los péptidos opioides como mediadores del placer.	32
2.9 Modulación de la actividad dopaminérgica por opioides.	33
III. El sistema opioide y el alcohol.	36
3.1. Papel de los péptidos opioides en la adquisición y el mantenimiento de la conducta de alto consumo de alcohol.	35
3.2. Modelos animales de alcoholismo y sistema opioide endógeno.	36
3.3. Efecto del alcohol sobre el sistema opioide endógeno.	40
3.3.1 Sistema β -endorfinérgico.	40
3.3.2 Efectos del alcohol sobre los sistemas de encefalinas y dinorfinas.	46
3.3.3 Efectos del alcohol sobre los receptores a opioides.	48
Planteamiento del problema.	51
Hipótesis.	53
Objetivos.	53
Métodos.	54

Presencia del ARNm de Proopiomelanocortina en la vía mesocorticolímbica.	55
Hibridación in situ del ARNm de Proopiomelanocortina.	55
Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la transcripción reversa del ARNm de Proopiomelanocortina.	56
Efecto del tratamiento agudo y crónico con alcohol sobre el contenido de la β-endorfina y la exposición prolongada a la droga sobre la unión de [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly(ol) tritiado (³H-DAMGO) al receptor opioide μ.	60
Tratamiento de los animales.	60
Radioinmunoensayo de β -endorfina.	61
Autoradiografía de receptores.	61
Análisis estadísticos.	62
Resultados.	63
Presencia del ARNm de Proopiomelanocortina en diversas regiones de la vía de recompensa del cerebro de la rata.	64
Efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -endorfina en regiones discretas del cerebro de la rata.	78
Efecto del consumo crónico de etanol sobre el contenido de β -endorfina y la unión de [³ H]-DAMGO al receptor opioide μ en regiones del cerebro de la rata.	80
Discusión.	89
I. Consideraciones metodológicas.	91
II. Presencia del ARNm de Proopiomelanocortina en diversas regiones del sistema DAérgico mesocorticolímbico.	92
III. Efectos del tratamiento agudo con alcohol.	96
IV. Efectos del tratamiento crónico con alcohol.	98
Conclusión General.	102
Bibliografía.	103
Anexo I.	116

Resumen

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico juega un papel importante en los mecanismos de adicción al alcohol. Los péptidos opioides modulan esta vía y se ha propuesto que actúan como mediadores de las propiedades reforzadoras de la droga. La beta-endorfina podría participar en el desarrollo de la adicción al alcohol por lo cual, el primer objetivo de este trabajo fue investigar si su precursor, el ARNm de la Proopiomelanocortina se encontraba presente en las regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico del cerebro de la rata. Utilizamos la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena. También hicimos uso de la técnica de hibridación in situ con el objetivo de conocer la distribución del ARNm de POMC. Encontramos que la amplificación del ARN extraído de las regiones de interés utilizando 2 pares de sondas distintas para POMC generó los productos de amplificación del tamaño esperado 94 y 678 pb. La omisión de la transcriptasa reversa en la reacción de RT de las muestras de tejido cerebral impidió la generación de los productos de la PCR de POMC. No se originó ningún producto de amplificación a partir de ARN extraído de la línea glial C-6 (la cual no expresa ARNm de POMC). De esta manera demostramos que la corteza prefrontal medial, el núcleo accumbens, y el área tegmental ventral de la rata contienen ARNm de POMC, el cual se encuentra en bajas concentraciones (entre 21 y 31% de lo detectado en el hipotálamo). Los experimentos de hibridación in situ confirman estos resultados y muestran que el ARNm de POMC está distribuido de manera homogénea en las regiones estudiadas. La presencia del ARNm de POMC en la vía dopaminérgica mesocorticolímbica podría tener una implicación funcional en las conductas motivadas. Debido a que demostramos previamente que la unión al receptor mu está alterado después de la administración aguda de etanol (Méndez et al., 2001), el siguiente objetivo fue investigar el efecto de la administración aguda y crónica de alcohol sobre el contenido de su ligando endógeno, la beta-endorfina en diversas regiones del sistema dopaminérgico y examinar si el tratamiento crónico con alcohol altera la unión del ligando al receptor mu en la vía de recompensa. Ratas Wistar macho recibieron una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg, el etanol fue diluido en agua destilada al 63.3 %)

o agua por vía intragástrica. Para los experimentos del efecto crónico del etanol las ratas fueron divididas en 4 grupos: ad libitum o control (C), etanol (E), sacarosa (S) y agua (A). Los grupos E y C tuvieron acceso ad libitum al alimento sólido y a una solución de etanol al 10 % (v/v) o agua, respectivamente. Los grupos S y A se alimentaron con la misma cantidad de comida y líquido que consumieron las ratas del grupo de etanol. El grupo S recibió una solución isocalórica de sacarosa y el grupo A agua. Este tratamiento se llevó a cabo durante 4 semanas. El contenido de beta-endorfina se cuantificó por radioinmunoensayo y los estudios de unión de ligando al receptor μ se realizaron por autoradiografía cuantitativa utilizando 8 nM de [3 H]-DAMGO. La administración aguda de etanol disminuyó (26 %) el contenido de beta-endorfina en el hipotálamo una hora después de la administración. No se observaron efectos del alcohol sobre el mesencéfalo, el área tegmental ventral, la sustancia nigra, el núcleo accumbens, el núcleo accumbens-septum y la corteza prefrontal. El tratamiento crónico con alcohol no cambió ni los niveles de beta-endorfina ni los de la unión de [3 H]-DAMGO al receptor μ en ninguna de las regiones estudiadas. Sin embargo, la sacarosa incrementó significativamente el contenido del péptido en el núcleo accumbens y la sustancia nigra en comparación con todos los demás grupos. Este hallazgo sugiere que los efectos reforzadores del alcohol y la sacarosa se producen a través de mecanismos neurales distintos e involucran regiones cerebrales específicas.

En conclusión la administración aguda de etanol produjo una disminución en la concentración de β -endorfina en el hipotálamo lo cual, podría ser importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol en la etapa inicial de la adicción. Después de un mes de exposición a la droga el contenido hipotalámico de beta-endorfina regresó a los niveles normales, lo cual podría indicar el desarrollo de tolerancia al alcohol. El tratamiento crónico con etanol no produjo cambios en los niveles del péptido ni en la unión de [3 H]-DAMGO al receptor μ en ninguna región estudiada contrario a lo causado por la administración aguda de etanol (Méndez et al., 2001). El consumo crónico produce cambios neuroadaptativos que impiden la expresión de estas respuestas iniciales. Sería interesante investigar en qué momento cambia la respuesta del sistema β -endorfinérgico al alcohol y si esto se relaciona con la expresión de la dependencia.

Lista de publicaciones

La presente tesis contiene los artículos que se enumeran a continuación.

- I. Leriche M, Cote-Vélez A, Méndez M. (2007) Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: Studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques. *Neuropeptides* 41: 421-31.
- II. Leriche M and Méndez M. (2010) Ethanol exposure selectively alters β -endorphin content but not [3H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain. *Neuropeptides* 44: 9-16.
- III. Leriche M, Méndez M, Zimmer L, and Béroud A. (2008) Acute Ethanol Induces Fos in GABAergic and non-GABAergic Forebrain Neurons: a Double- Labelling Study in the Medial Prefrontal Cortex and Extended Amygdala. *Neuroscience* 153: 259-267. Esta publicación surgió de un proyecto de colaboración suplementario al objetivo central de esta tesis por lo cual, sólo se incluye como anexo (Anexo I).

Introducción

La dependencia o adicción al alcohol (o alcoholismo) se define como la pérdida de control sobre el consumo de la droga. El alcoholismo representa un grave problema de salud pública. El consumo indiscriminado de alcohol no sólo daña la salud y la calidad de vida, sino que también menoscaba el bienestar social y familiar. La dependencia al alcohol se establece mediante el uso y abuso continuo de esta droga. Durante el desarrollo del proceso de adicción, el individuo requiere de dosis cada vez mayores de la droga para obtener el efecto inicial con dosis bajas, fenómeno conocido como tolerancia. Una vez que el individuo se hace dependiente a la droga, sí deja de utilizarla, presenta el síndrome de abstinencia, que dependiendo de la gravedad del caso puede incluir síntomas tales como manos temblorosas, insomnio, náuseas o vómito, alucinaciones, agitación psicomotora, ansiedad, convulsiones, etc. (Zigmond, et al. 1999).

Las drogas de abuso actúan a través de mecanismos de reforzamiento tanto positivo como negativo. El principio del reforzamiento (Skinner, 1953) sostiene que un comportamiento se aprende por sus consecuencias. Un reforzador es cualquier evento que produce un efecto satisfactorio (una felicitación, un abrazo, un estímulo monetario, etc.) y es producido por una conducta específica. Así, la probabilidad de que esta conducta se lleve a cabo aumentará. Por ejemplo, un individuo que bebe alcohol, lo cual le produce euforia, querrá repetir esa experiencia. El reforzamiento negativo también aumenta la posibilidad de que se realice una conducta pero en este caso, la satisfacción es a través de la inhibición (total o parcial) de una sensación desagradable; por ejemplo, la ansiedad se puede reducir temporalmente al tomar alcohol desarrollando una propensión a tomar de nuevo. Consecuentemente, la experiencia “agradable” de beber se relaciona a la euforia inducida por el alcohol, y/o al alivio de la ansiedad (Pihl y Peterson, 1992). Así, las propiedades reforzadoras del etanol contribuyen a la ingesta continua, al abuso y eventualmente, al desarrollo de la dependencia de la droga. Se ha propuesto este reforzamiento ocurre a través de la activación de circuitos neuronales específicos, en particular del sistema dopaminérgico (DAérgico) mesocorticolímbico (Koob, 1992; Wise y Rompre, 1989). Esta vía se origina en el área tegmental ventral (ATV) y proyecta hacia el núcleo accumbens (NAcc) y la corteza prefrontal (CPF) entre otras (Kandel et al., 1991).

El desarrollo de líneas de roedores seleccionadas genéticamente para manifestar diferentes preferencias por la sustancia ha sido ampliamente utilizado para identificar algunos de los sustratos neurales y de los sistemas de neurotransmisores implicados. Por ejemplo, se ha observado que las ratas que prefieren etanol presentan mayor sensibilidad del sistema opioide (SO) a la droga (De Waele et al., 1992; Li et al., 1998).

El etanol afecta varios circuitos de neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro. El etanol además de activar la vía dopaminérgica mesolímbica y a los péptidos opioides, también altera de manera importante al sistema del ácido γ -aminobutírico (GABA) y al de glutamato, y aunque en menor grado, a los sistemas serotoninérgico y de acetilcolina así como, diversos neuropéptidos (e.g. factor liberador de corticotropina (CRF) y al neuropéptido Y (Vengeliene et al., 2008).

I. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.

1.1 Descripción anatómica.

Los principales componentes anatómicos del sistema DAérgico mesocorticolímbico son el ATV y el cerebro anterior basal (núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza frontal y amígdala) (Zigmond et al., 1999). Los grupos celulares dopaminérgicos se han clasificado en dos grupos principales con base en sus proyecciones eferentes: 1) los sistemas mesolímbico y mesocortical, cuyos somas están localizados en el ATV (área A10 y algunas de A9) 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) (área A9) y proyectan sus axones hacia diversas áreas tales como el estriado, el núcleo subtalámico, etc (Kandel et al., 1991) (Figura 1 y Tabla 1).

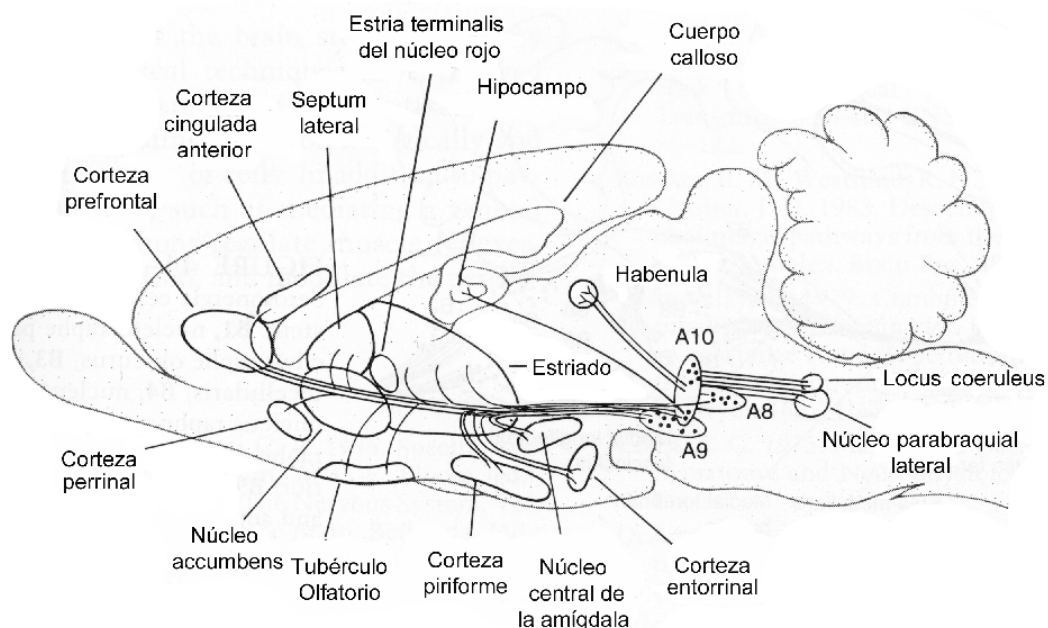


Figura 1. Sistema dopaminérgico mesolímbico. Los cuerpos celulares de las vías dopaminérgicas meso-accumbens y meso-cortical se localizan en el área A10 (área tegmental ventral), mientras que los de la vía nigroestriatal se encuentran en A9 (sustancia nigra compacta) (Tomado de Kandel 1991).

Tabla 1. Organización de los grupos celulares dopaminérgicos.

Vía	Células de origen	Proyecciones
Mesolímbico y mesocortical.	ATV	Áreas límbicas y corticales: Núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, cortezas cingulada, prefrontal, piriforme y entorrinal, habénula, septum, amígdala, locus coeruleus.
Nigroestriatal	SN compacta	Caudado putamen, globo pálido, núcleo subtalámico y neocorteza

(Modificado de Kandel et al., 1991.)

1.2. El circuito de recompensa y las drogas de abuso.

En los 50's James Olds realizó uno de los más grandes descubrimientos en el campo de sustratos neurales del comportamiento: la vía de recompensa en el cerebro (Olds y Milner, 1954) que encontró por serendipia al estar estudiando el sistema de

activación reticular (SAR). Utilizando ratas que tenían implantado un electrodo en una de las regiones del SAR para ser estimulada eléctricamente, Olds observó que algunas siempre regresaban al lugar a donde se les había aplicado la estimulación. La idea que surgió de esta modesta observación, fue que la estimulación eléctrica en determinadas regiones del cerebro tiene propiedades reforzadoras, ya que al igual que proporcionar una recompensa convencional (e.g., alimento) se aumenta la probabilidad de que la conducta que la originó sea repetida, regresar al lugar donde se estimuló (Milner, 1991). Esta hipótesis se comprobó en una cámara operante de Skinner; en este modelo experimental la rata tiene un electrodo implantado en el cerebro y recibe una corriente eléctrica al presionar una palanca. Cuando la estimulación intracraneal produce la activación de áreas del cerebro involucradas en la recompensa, la rata presiona persistentemente la palanca. Este tipo de auto-estimulación es conocido como estimulación cerebral de recompensa (ECR). Inicialmente se identificaron dos regiones donde se auto-estimulaban las ratas: el septum y el tracto mamilotálamico (Olds y Milner, 1954). Posteriormente, Olds (1962) identificó al tracto medial del cerebro anterior como el componente central del sistema de auto-estimulación, y más tarde con técnicas electrofisiológicas y neuroquímicas, se identificó al sistema DAérgico mesocorticolímbico como el principal sustrato neuroanatómico de la ECR (Wise y Bozarth, 1984; Bozarth, 1987).

Los reforzadores son objetos o eventos que producen una sensación placentera. Así, la obtención de un reforzador aumentará la probabilidad y la intensidad de la conducta que la generó (Skinner, 1953). El sistema de recompensa del cerebro dirige el comportamiento de los individuos hacia objetivos que, generalmente, son benéficos y promueven la sobrevivencia del individuo (e.g., consumo de agua y comida) e incluso de la especie (e.g., reproducción) (Troland, 1928). Para fines prácticos, nos referiremos a estos reforzadores en general como reforzadores naturales si bien, la búsqueda del placer puede volverse obsesiva. Desafortunadamente, varias drogas de abuso son capaces de activar al sistema dopaminérgico mesolímbico con una potencia mucho mayor que la que producen los reforzadores naturales ocasionando pérdida del control del comportamiento

favoreciéndose la búsqueda de la droga sobre la de los reforzadores que promueven la sobrevivencia.

1.3. Sustratos neurales del alcohol.

El alcohol afecta de manera importante eventos de la transmisión DAérgica del sistema mesocorticolímbico. Utilizando el modelo de ECR 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 Kornetsky, 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 (BAC por sus siglas en inglés blood alcohol concentration) está aumentando. Durante la fase de disminución de la BAC, no se observa el aumento en ECR (Lewis y June, 1990). Así, la presencia del etanol potencia el reforzamiento producido por la ECR. Estos estudios demuestran que el etanol, como otras drogas de abuso, facilita la ECR y tiene efectos reforzadores.

Di Chiara e Imperato, (1988) demostraron que drogas de abuso tales como los opiáceos, el etanol, la nicotina, las anfetaminas y la cocaína aumentan la liberación de DA en el NAcc. El etanol incrementa la síntesis, la liberación (Di Chiara e Imperato, 1985; Imperato y Di Chiara 1986) y el recambio de dopamina (DA) en el NAcc (Carrol et al., 2006), así como la frecuencia de disparo de las neuronas DAérgicas del ATV, tanto in vivo, (Gessa et al., 1985) como in vitro (Brodie et al., 1990). La liberación de DA y la subsecuente activación de sus receptores podría ser importante en la motivación por beber ya que la administración de antagonistas DA inhibe el consumo de alcohol mientras que agonistas DA prolongan el consumo de alcohol (Samson et al., 1992; Vengeliene et al., 2008).

Los sustratos neuroanatómicos que median los efectos reforzadores del alcohol incluyen varias regiones del sistema límbico (Gatto et al., 1994; Rodd-Henricks et al., 2000). Dado que un aumento en la actividad de las neuronas DAérgicas del ATV está asociada con los procesos de reforzamiento (Wise, 1980) y que el alcohol activa el

sistema DAérgico mesocorticolímbico, el ATV fue la primera región investigada. Gatto y colaboradores (1994), observaron que las ratas P (genéticamente seleccionadas para preferir alcohol) se auto-administraban alcohol directamente en la región medial-posterior del ATV, mientras que las ratas NP (genéticamente seleccionadas para no preferir alcohol) no. Estos resultados sugieren que el alcohol se comporta como un reforzador cuando es administrado en el ATV de las ratas P y que existen factores genéticos que propician esta conducta. La auto-administración de esta droga en el ATV también se ha observado en ratas Wistar (Rodd-Henricks et al., 2000).

La activación del sistema DAérgico mesolímbico es un evento importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol si bien no es indispensable para la adquisición y/o mantenimiento del consumo de la droga (Rassnick et al., 1993a, Ikemoto et al., 1997, Koistinen et al., 2001, Shoemaker et al., 2002). Utilizando diversos modelos de autoadministración se demostró que la lesión del NAcc con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no impide la adquisición de la conducta de consumo de alcohol ni el mantenimiento de ésta (Rassnick et al., 1993a, Ikemoto et al., 1997, Koistinen et al., 2001, Shoemaker et al., 2002). Así, se concluye que la liberación de DA en el NAcc no es exclusiva en estos procesos y que otros sistemas de neurotransmisión participan de manera importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol; por ejemplo si a ratas lesionadas con 6-OHDA se les administra un antagonista no selectivo de receptores a opioides hay una disminución significativa en el consumo de etanol (Koistinen et al., 2001, Shoemaker et al., 2002). Estos estudios sugieren que el sistema opioide es crucial para reforzar la auto-administración de alcohol. En el capítulo III de la introducción se discutirá detalladamente el papel del sistema opioide en los procesos de adicción al alcohol.

II. Péptidos opioides.

2.1 Familias de péptidos opioides.

Alrededor de la década de los 70's descubrieron diversos péptidos con actividad biológica similar a los opiáceos. En 1974, Huges logró purificar, a partir de

homogenados de cerebro de cerdo, una substancia con propiedades parecidas a las de la morfina, cuyos efectos eran revertidos por naloxona y naltrexona (Huges, 1975) que posteriormente se demostró estaba constituida por dos pentapéptidos que llamaron encefalinas (Huges et al., 1975). Paralelamente, otro grupo identificó un péptido aislado de la hipófisis de camello que se comportaba como la morfina compuesto de 31 residuos de aminoácidos (aa) al que se le llamó β -endorfina (β -END) (Li y Chung, 1976). La dinorfina, que es considerada el agonista endógeno del receptor opioide kappa (κ), fue aislada a partir de la pituitaria de cerdo (Goldstein et al., 1981).

Existen principalmente tres familias de péptidos opioides: las endorfinas, las encefalinas y las dinorfinas, las cuales provienen de tres precursores distintos. A partir de la Proopiomelanocortina (POMC) se origina la β -lipotropina, la cual sirve como prohormona para generar las α -, β - y γ - endorfinas y la hormona estimulante de melanocitos β (β -MSH) (Chretien and Seidah, 1981). La Leu- y Met-encefalinas (Leu-enk y Met-enk) son pentapéptidos que se derivan de la Proencefalina (Comb et al., 1982) y difieren entre sí únicamente en el último aminoácido del lado carboxilo terminal. Las dinorfinas son péptidos opioides derivados de un precursor diferente, la Prodinorfina (Comb et al., 1982). En la tabla 2 se muestran los precursores, la estructura de los péptidos opioides y su selectividad por los receptores a opioides (Strand et al., 1999). En la década de los 90's se descubrieron otros péptidos opioides, la nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) (Reinscheid et al., 1995) que se une selectivamente al receptor de la N/OFQ (NOP) (Chiou et al., 2004) y las endomorfina 1 y 2 (Zadina et al., 1997). Dada la alta selectividad y afinidad de las endomorfina al receptor μ Zadina las propuso como su ligando "endógeno" sin embargo, algunos estudios cuestionan esta aseveración basándose en el hecho de que no se ha encontrado su precursor protéico (Terskiy et al., 2007).

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

Precursor	Péptido opioide	Estructura	Selectividad (receptores)
Pro-opiomelanocortina (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)	[Leu5]Enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$\delta > \mu \gg \kappa$
	[Met5]Enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	$\mu \approx \delta \gg \kappa$
	[Met5]Enkefalina-Arg6-Phe7	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	
Prodinorfina (Proencefalina B)	Dinorfina A (1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Aso-Asn-Gly	$\kappa \gg \mu > \delta$
	Dinorfina A (1-13)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys	$\kappa > \delta \approx \mu$
	Dinorfina A (1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile	$\kappa > \delta \approx \mu$
Pronociceptina	Nociceptina/ Orfanina FQ	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	NOP/OLR1
Desconocido	Endomorfina 1	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂	μ
	Endomorfina 2	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	μ

Modificado de Borsodi y Thoth, 1995 y Fichna y colaboradores, 2007.

2.2 Biosíntesis y procesamiento de los péptidos opioides.

Los péptidos opioides son originados a partir de grandes moléculas precursoras proteicas (de entre 10 y 36 KD), las cuales se sintetizan en el retículo endoplásmico del soma neuronal, son transportados a través del Golgi para ser empaquetados junto con enzimas procesadoras, en el Trans Golgi en gránulos de secreción que son transportados a través de mecanismos de flujo axonal rápido (es decir, a una velocidad de 100nm en 24 h) (Pasantes et al., 1991) hasta la terminal sináptica. El procesamiento de los precursores a péptidos activos se lleva a cabo por enzimas que reconocen aminoácidos básicos (Lys, Arg) llamadas convertasas, por carboxypeptidasas que remueven estos aminoácidos y, dependiendo del tejido en que se encuentren, un mismo precursor puede dar origen a péptidos de distintos tamaños (i.e. β -endorfina o, MSH, y otros [Figura 2]) además, pueden ser modificados (acetilación, la amidación, la fosforilación, la metilación y/o la glucosilación) (Strand, 1999).

El ARNm de la POMC se encuentra en niveles altos en la hipófisis y en el hipotálamo, mientras que la corteza, el estriado, el hipocampo, la amígdala y el cerebelo contienen cantidades bajas de este ARNm (Civelli et al., 1982; Grauerholz et al., 1998). Estos estudios indican que las neuronas productoras de POMC no están limitadas al hipotálamo y el NTS como se pensaba anteriormente. La POMC da origen a varios neuropéptidos con actividad biológica (Figura 2). Estos péptidos están distribuidos diferencialmente en las distintas áreas del cerebro y la hipófisis (o pituitaria). En el lóbulo anterior de la hipófisis (también llamada adenohipófisis), el procesamiento de la POMC produce principalmente la hormona adenocorticotrópica (ACTH), la β -lipotropina y la β -endorfina. Sin embargo, en el lóbulo intermedio de la hipófisis (también conocida como la neurohipófisis) o en el núcleo arcuato del hipotálamo, la POMC es procesada a péptidos más pequeños tales como la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), la β -endorfina y el péptido parecido a la corticotropina (CLIP), entre otros.

El ARNm de la Proencefalina se encuentra en numerosas regiones del cerebro tales como; la corteza, el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, el estriado, el septum lateral, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el cerebelo, el mesencéfalo y la médula espinal entre otras (Harlan et al., 1987). La Pro-encefalina es una molécula precursora que contiene una copia de Leu-enk, cuatro copias de Met-enk y una copia de varios péptidos con la secuencia de la Met-enk extendida en el lado carboxilo terminal (la Met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, (ME-RGL) y la Met-enk-Arg⁶-Phe⁷ (ME-RF) (Figura 3 A) pero su procesamiento también puede depender del tejido en el que se encuentre (Saravia et al., 1993).

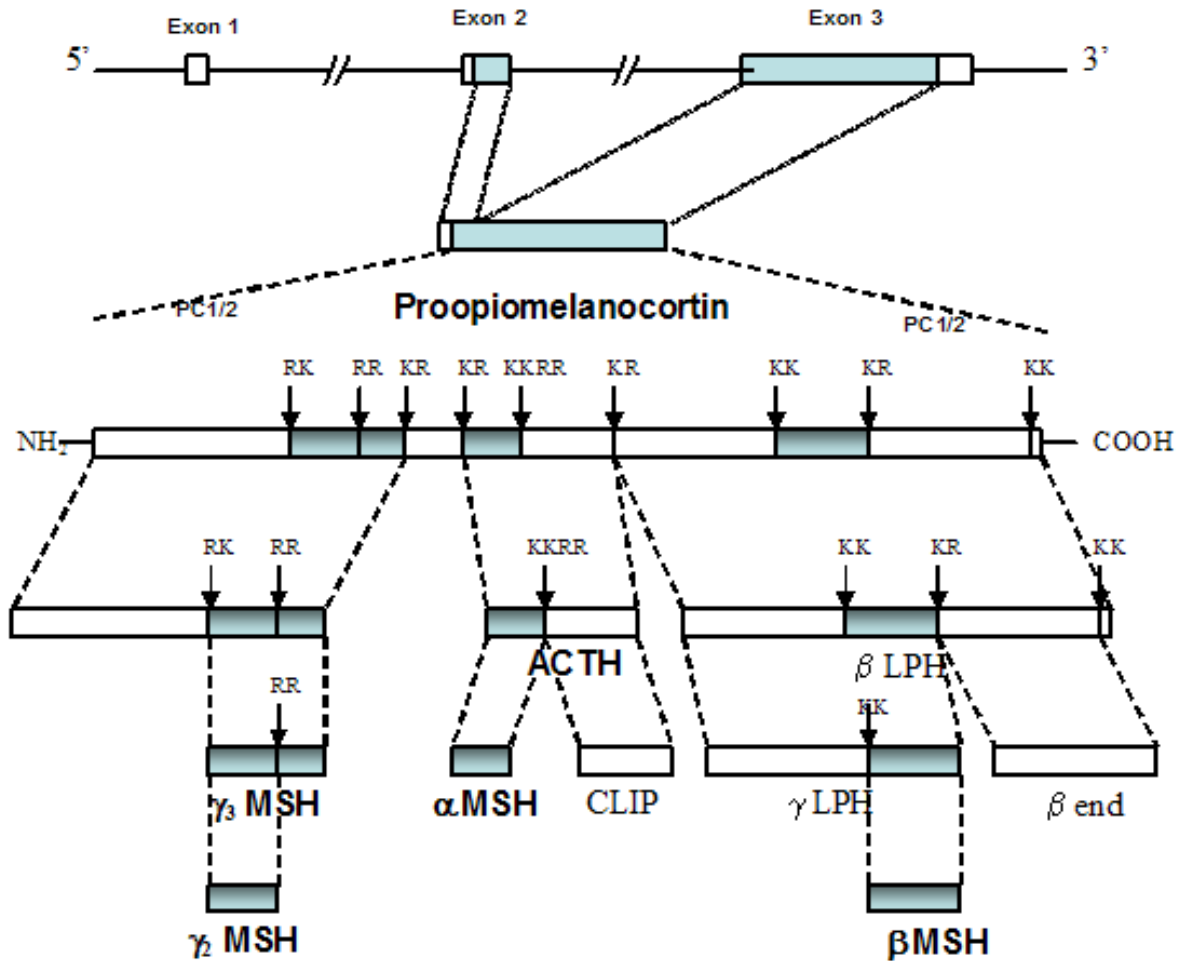


Figura 2. Estructura del gen y procesamiento post-traduccional de la POMC. El POMC en los mamíferos está formado por 3 exones de los cuales, los 2 últimos son traducidos. Las convertasas de pro-hormonas 1 y 2 (PC1 y PC2) cortan al precursor peptídico en péptidos más pequeños de manera sucesiva. KK KR y RK indican la posición de los pares de aa básicos donde se llevan a cabo los cortes de la cadena. Los productos finales se generan de manera específica dependiendo del tejido, por ejemplo α -MSH y ACTH no son producidas en las mismas células de la pituitaria. Los productos finales incluyen melanocortinas (la hormona estimulante de melanocitos (MSH) y la hormona adenocorticotrópica (ACTH)); β -endorfina (β -end) y el péptido parecido a la corticotropina (CLIP)). Las lipotropinas (α y γ -LPH) son productos intermedios del procesamiento cuya actividad biológica aun no es clara. Tomado de Millington, 2007.

El ARNm de la Prodinorfina se encuentra en altas densidades en regiones tales como el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo, el estriado y el giro dentado (Morris et al., 1986). La Prodinorfina produce una copia de Leu-enk así como varios péptidos relacionados estructuralmente con esta (Figura 3 B); da origen a las dinorfinas 1-17, 1-13 y 1-8, y a la α -neo-endorfina, entre otros péptidos biológicamente activos dependiendo del tejido donde son procesados, originando 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-enk, la cual tiene alta afinidad por el receptor delta (δ).

El ARNm de la Pronociceptina (PNOC) se presenta en altas densidades en el septum lateral, la parte anterior del hipotálamo, el núcleo de la cama de la estría terminal, los núcleos central y medial de la amígdala, el núcleo reticular del tálamo, etc. En contraste, la neocorteza, el hipocampo y el giro dentado contienen bajos niveles de este ARNm (Nothacker et al., 1996). La Pronociceptina da origen a la nocistatina, la nociceptina y la prepronociceptina₁₅₄₋₁₈₁, (PPNOC₁₅₄₋₁₈₁) (Figura 3 C).

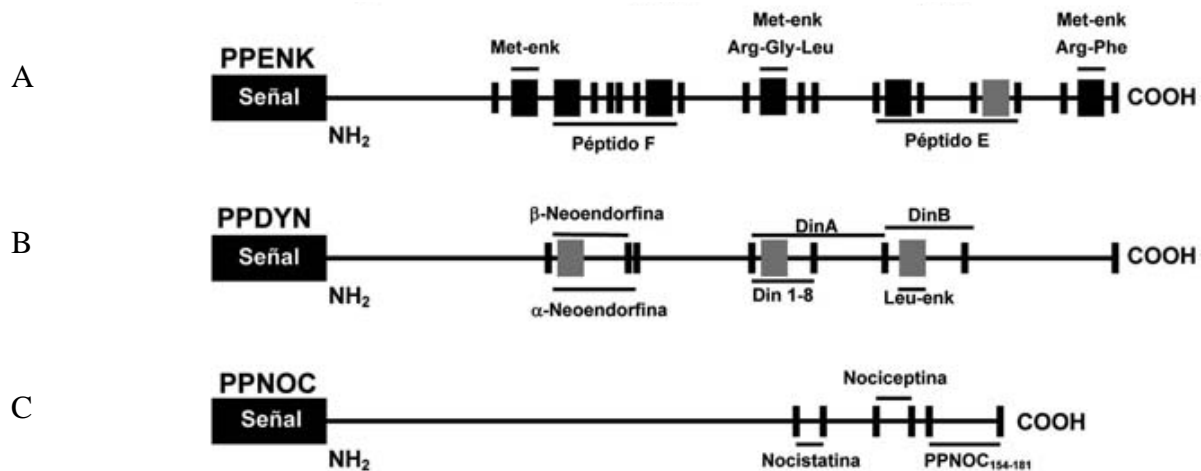


Figura 3. Esquema de los precursores de las encefalinas y dinorfinas. (A) La Preproencefalina (PPENK) da origen a péptidos tales como, la Metionina-encefalina (Met-enk) y sus formas extendidas del lado carboxilo terminal (la Met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ y la Met-enk-Arg⁶-Phe⁷) así como la Leucina-encefalina (Leu-enk, no marcada en A) y los péptido E y F. (B) La Preprodinorfina (PPDYN) y los péptidos que produce: α y β -neoendorfina, dinorfina A, B y 1-8 (DinA, DinB y Din1-8) y Leu-enk. (C) La Prepronociceptina (PPNOC) y sus fragmentos nocistatina, nociceptina y prepronociceptina₁₅₄₋₁₈₁, (PPNOC₁₅₄₋₁₈₁). Tomado de Vega, 2005.

Diversos grupos de investigación han buscado al gene y al precursor (o precursores) de las endomorfina sin embargo, aun no ha sido descubierto (Perlikowska et al., 2009). Terskiy y colaboradores (2007) llevaron a cabo la búsqueda bioinformática de este precursor protéico en el genoma humano y no encontraron evidencia de su existencia. Alternativamente, otras rutas de biosíntesis podrían

explicar la presencia de la endomorfina 2 en los ganglios espinales dorsales (Rónai et al., 2009).

2.3 Distribución de los péptidos opioides.

Los péptidos opioides están ampliamente distribuidos en el SNC (Tabla 3) y SNP. En el SNC existen principalmente dos grupos celulares que producen β -endorfina. El más importante se encuentra en los núcleos arcuatos del hipotálamo. Este grupo celular proyecta sus axones a diversas áreas del sistema límbico y del tallo cerebral. El segundo grupo celular se encuentra en la región comisural del núcleo del tracto solitario (Akil et al., 1984). Las fibras de estos cuerpos celulares inervan principalmente regiones vecinas del bulbo raquídeo. Las neuronas que sintetizan POMC podrían no estar restringidas a estos núcleos ya que estudios de inmunohistoquímica muestran que la Proopiomelanocortina también se encuentra en bajas densidades en el NAcc, el septum, el núcleo paraventricular del tálamo, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, el ATV, etc. (Bloom et al., 1978) (Tabla 4).

La Proencefalina, la Prodinorfina y la Pronociceptina están ampliamente distribuidas en el cerebro al igual que los péptidos opioides a los que dan origen (Akil et al., 1984; Bloom et al., 1999; Neal et al., 1999) (Tabla 3 y 4). Las endomorfina también se presentan en numerosos núcleos cerebrales distribuidas de manera diferencial (Fichna et al., 2007) (Tabla 3). Estas diferencias en la distribución podrían indicar la existencia de precursores específicos para cada endomorfina o el procesamiento diferencial del mismo precursor dependiendo de la región cerebral (Fichna et al., 2007). Por otro lado, cabe mencionar que los anticuerpos utilizados para llevar a cabo la descripción neuroanatómica de la endomorfina 2, presenta reactividad cruzada con diversas proteínas (Terskiy et al., 2007).

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

Región del SNC	β -endorfina	Enkefalinas	Dinorfinas	Nociceptina	Endomorfinas 1 / 2
Telencéfalo					
<i>Corteza</i>					4-3 / 0
<i>Corteza entorrinal</i>	3	0	0	0	
Formación Hipocámpal					
<i>Hipocampo</i>	0	2	3	0 - 3	0 / 0
<i>Giro dentado</i>	0	2	3	0 - 2	
<i>Tubérculo olfatorio</i>	0	2	2	0 - 2	
<i>Núcleo accumbens</i>	1	3	2	1	4 / 3
<i>Caudado putamen</i>	0	3	2	1	4 / 0
<i>Globo pálido</i>	0	5	4	3	0 / 0
<i>Septum</i>	3	3	0	0 - 3	4 / 3
<i>Núcleo de la cama de la estra terminal</i>	4	3	0	1 - 4	4 / 4
Diencefalo					
Hipotálamo					
<i>Núcleo supraóptico</i>	0	1	3	0	4 / 4
<i>Núcleo paraventricular</i>	4	4	3	1 - 2	
<i>Núcleo arcuato</i>	5	3	2	3	
<i>Área hipotalámica lateral</i>	3	2	3	3	
Tálamo					
<i>Núcleo paraventricular</i>	4	4	3	0	4-3 / 4-0 4 / 4
Mesencefalo					
Substancia nigra					
<i>Pars compacta</i>	1	1	0	2	
<i>Pars reticulata</i>	0	0	4	3	
<i>Substancia gris periacueductal</i>	4	3	2	4	4 / 4
<i>Colículo superior, inferior</i>	2	3	0	0-3	3 / 3
<i>Núcleo dorsal de rafé</i>	4	3	2	2	3 / 3

5 = densidad muy alta; 4 = densidad alta; 3 = densidad moderada; 2 = densidad baja; 1 = densidad muy baja; 0 = no detectable. Los rangos indican que la densidad varía dependiendo la sub-área estudiada. Modificado de Akil et al., 1984; Fichna et al., 2007 y Neal et al., 1999.

Tabla 4. Distribución los precursores de péptidos opioides en el cerebro de la rata.

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

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

2.4. Liberación y degradación.

Los opioides, como otros neuropéptidos, se almacenan en los gránulos de secreción que son vesículas electrodensas, relativamente grandes (>70 nm) y su liberación es dependiente de Ca^{2+} (Strand et al., 1999) pero se requiere una frecuencia de disparo mayor que la utilizada por los neurotransmisores clásicos, de tal manera que solo un incremento en la frecuencia de disparo produce la exocitosis de los péptidos (Hokfelt, 1991). Los péptidos liberados son capaces de difundir a distancias relativamente largas si no son degradados (Duggan, 1990).

Diversos estímulos pueden activar a las células peptidérgicas induciendo la liberación de los péptidos opioides. Por ejemplo, el estrés aumenta la liberación de Met-enk de la médula adrenal (Strand et al., 1999) y bajas concentraciones de etanol aumentan la liberación de β -endorfina en células hipotalámicas en cultivo (Gianoulakis, 1990).

Una vez que los péptidos opioides son liberados pueden llevarse a cabo diversos procesos de inactivación, tales como la difusión, la endocitosis mediada por receptores y la degradación de los péptidos mediante la acción de ectopeptidasas. La inactivación por peptidasas se lleva a cabo de manera muy rápida y se ha observado que los péptidos opioides son degradados por diversas enzimas de la familia de las metalopeptidasas tales como la aminopeptidasa N (APN, EC 3.4.11.2), exopeptidasa que hidroliza el enlace $\text{Tyr}^1\text{-Gly}^2$ (de la Baume et al, 1983); la endopeptidasa neutral 24.11 (NEP o neprilina, EC 3.4.24.11), conocida como Encefalinasa, hidroliza el enlace $\text{Gly}^3\text{-Phe}^4$ (White et al., 1985); la enzima que convierte a la angiotensina (ACE, EC 3.4.15.1), tiene actividad de dipeptidil carboxipeptidasa que hidroliza $\text{Gly}^3\text{-Phe}^4$; y una dipeptidasa membranal (EC 3.4.13.11) que hidroliza el enlace $\text{Gly}^3\text{-Gly}^4$ (Schwartz et al., 1981). La β -END pierde su actividad opioide al ser hidrolizada por las convertasas 1 y 2 (Nicolas P, 1988) así como; por las endopeptidasas, la aminopeptidasa y la carboxipeptidasa (Burbach et al., 1981). La regulación de la actividad enzimática de estas ectopeptidasas puede influir en la cantidad del péptido liberado.

2.5. Receptores a opioides.

La existencia de receptores a opioides se demostró con experimentos de unión usando ligandos opiáceos marcados radioactivamente (Simon et al. 1973; Terenius, 1973). Martin y sus colaboradores (1976) reportaron la primera evidencia farmacológica de la existencia de varios tipos de receptores a opioides basándose en la acción de diversos opiáceos y sus derivados; identificaron al receptor μ (de morfina) y al κ (de ketociclazocina). Lord y sus colaboradores (1977) encontraron un receptor en el vas deferens de la rata al cual se unían con alta afinidad las encefalinas y lo llamaron receptor δ . En 1994 diversos grupos de investigación describieron un cuarto receptor a opioides en varias especies (i.e. humano, rata y ratón) y en el caso del humano se le llamó “orphan receptor” (ORL1) debido a que no se conocía su ligando endógeno. Actualmente se conoce como NOP independientemente de la especie a la que pertenezca (Jeffrey et al., 2001).

La caracterización farmacológica de los receptores a opioides mostró la existencia de distintos subtipos de estos 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, Raynor et al., 1994). Las sustancias del tipo de la morfina tienen alta afinidad por el subtipo de receptor opioide μ y las sustancias parecidas a la dinorfina tienen alta afinidad por el receptor κ (Tabla 5). El NOP reconoce selectivamente a la nociceptina y presenta alta afinidad por esta, en la tabla 5 se mencionan algunos ejemplos de agonistas y antagonistas para este receptor (Jeffrey et al., 2001). Algunos grupos de investigadores han hecho una clasificación más fina de los subtipos de receptores basándose en estudios farmacológicos y de unión de ligandos 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) y κ_1 y κ_2 (Attali et al., 1982).

Existen cuatro genes para receptores a opioides, los cuales en el caso del humano se encuentran localizados en diferentes cromosomas del genoma. El gen del receptor μ se encuentra en el cromosoma 6q24-25 (Wang et al., 1994), el del receptor

Tabla 5. Agonistas y antagonistas de los receptores a opioides.

Receptor	μ	δ	κ	NOP
Agonistas	β -endorfina	[Met]encefalina	dinorfina	Nociceptina/Orfanina FQ
	Endomorfina 1	[Leu]encefalina	ketociclazocina	UFP-102
	Endomorfina 2	DADLE	Tifuadoma	
	morfina	DSTLE	Bramazocina	
	dihidromorfina	DAMEA	U-50488	
	oximorfona	DPDPE	U-69593	
	DAMGO		Mr 2034	
	morficeptina			
	β -casomorfina PL-017			
Antagonistas	naloxona	naloxona	naloxona	Nocistatina
	naltrexona	naltrexona	naltrexona	UFP-101
	β -funaltrexamina	ICI 154, 129	Mr 2266	
	CTOP	ICI 171, 864	WIN 44441-3	

DAMGO = [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly(1o)
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)
ICI 154,129 e ICI 174,866 = análogos de las encefalinas
MR 2266 = [(-)-2-(3 furylmethyl)-normetazocina]
PL-017 = [N-MePhe³D-Pro⁴]morficeptina
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-(+)-3,4-dicloro-N-metil-N-[2-(pirrolidinil)-ciclohexil]-bencenoacetamida
WIN 44441-3 = (1-cyclopentyl-5-(1,2,3,4,5,6-hexahidroxi-3,6,11-trimetil-2 -6-metano-3- benzazocin)-3-pentatona metano sulfonato)
UFP-102 = [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]nociceptin/orphanin FQ-NH₂
Nocistatina (humano) = Met-Pro-Arg-Val-Arg-Ser-Leu-Phe-Gln-Glu-Gln-Glu-Glu-Pro-Glu-Pro-Gly-Met-Glu-Glu-Ala-Gly-Glu-Met-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln
UFP-101 = [Nphe¹, Arg¹⁴, Lys¹⁵] N/OFQ-NH₂
(Modificada de Adler et al., 1990, Zadina et al., 1997 y Chiou et al., 2007).

δ en el cromosoma 1p34.3-36.1 (Befort et al., 1994), el del receptor κ en el cromosoma 8q11.2 (Yasuda et. al., 1994) y el del receptor NOP en el 20q13.33. Sus exones e intrones tienen una organización muy parecida, lo cual indica que posiblemente derivan de un gen antecesor común (Wang et al., 1994). Los cuatro tipos de receptores a opioides pertenecen a la subfamilia de receptores a rodopsina, que a su vez forma

parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Wess, 1998) y se componen de 7 dominios transmembranales. Los receptores a opioides μ , δ y κ tienen una similitud de secuencia de aminoácidos del 60 al 67% entre sí. La mayor parte de las diferencias se presenta en las secuencias de aa de los extremos amino y carboxilo terminales, así como 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 5).

Receptor opioide μ

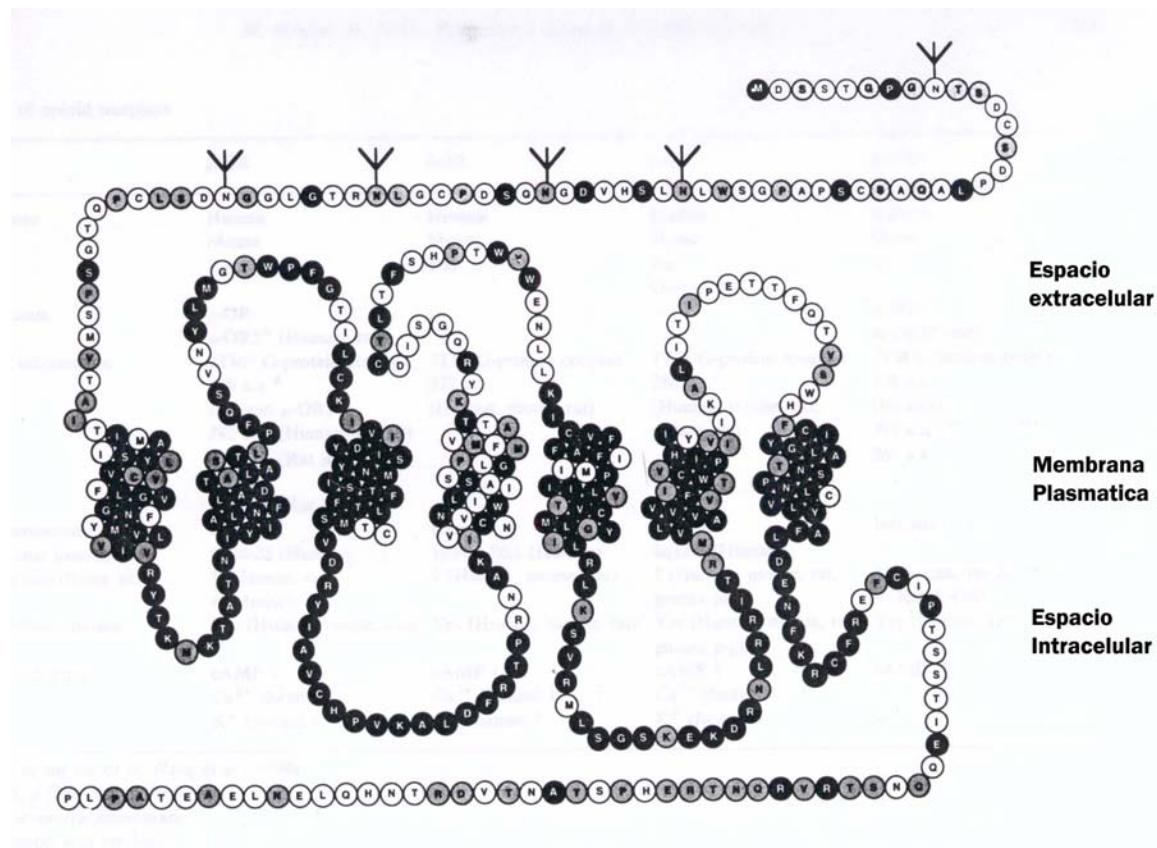


Figura 4. Modelo del receptor opioide μ de la rata. En este esquema se muestran los 7 dominios transmembranales que conforman al receptor, las asas intracelulares y extracelulares y los extremos amino (extracelular) y carboxilo (intracelular) terminales. Los aa señalados (Y) son los sitios potenciales de glucosilación. 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. Los residuos de aa del receptor μ que no están conservados en ninguno de los dos receptores a opioides (δ y κ) se presentan en blanco. (Minami y Satoh, 1995)

Los receptores a opioides están acoplados a proteínas Gi/Go, y regulan múltiples sistemas de efectores tales como la adenilato ciclasa, canales de calcio y potasio dependientes de voltaje y proteínas cinasas (Kieffer, 1995; Minami y Satoh, 1995). Las proteínas G son heterodiméricas, están asociadas a la membrana y están compuestas de las subunidades α , β y γ . Las subunidades α de las diferentes proteínas G contienen dominios homólogos para la unión e hidrólisis del GTP y dominios variables para el reconocimiento del receptor y las interacciones con el efector (Gilman, 1987). La activación de los receptores a opioides resulta en una disociación de la proteína G en las subunidades α y $\beta\gamma$ y estas subunidades regulan la actividad de sus respectivos efectores. El efecto bioquímico mejor caracterizado de los péptidos opioides es la inhibición de la adenilato ciclasa por Gi, como en el caso de la activación de los receptores δ por encefalinas (Ross, 1992). Sin embargo, existen otros componentes intracelulares que regulan la actividad de los GPCRs. Se ha sugerido que los mecanismos moleculares que llevan a la desensibilización de los GPCRs son similares a los reportados para el receptor β 2-adrenérgico (ya que pertenecen a la misma subfamilia de receptores a rodopsina) (Lefkowitz, 1998). La unión del agonista al receptor β 2-adrenérgico induce una rápida fosforilación del receptor por proteínas cinasas, incluyendo las cinasas de GPCRs (GRKs), lo cual promueve la asociación de la arrestina al receptor, desacoplándolo de la proteína G e internalizándolo (Lohse et al., 1990). Varios autores reportan la fosforilación como un mecanismo de desensibilización de los receptores a opioides μ (Arden et al., 1995), δ (Pei et al., 1995) y κ (Appleyard et al., 1997). Estudios realizados con los receptores μ (Zhang et al., 1996; El-Kohuen et al., 1999) y δ (Pei et al., 1995) sugieren que la fosforilación inducida por los agonistas es mediada vía GRKs y no por la proteína cinasa C. La fosforilación del receptor μ es muy rápida (minutos), lo cual no corresponde con la tasa de desensibilización del receptor, que se lleva a cabo en horas (El-Kohuen et al., 1999). La fosforilación del receptor μ podría involucrar otras proteínas cinasas, tales como las que son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (Wang et al., 1996). Sin embargo, la tasa de desensibilización relativamente lenta de este receptor podría ser atribuida, al menos parcialmente, al reciclaje de los receptores internalizados (Law et

al., 2000). En el caso del receptor δ numerosos estudios sugieren una clara relación entre la fosforilación de este receptor y su desensibilización (Pei et al., 1995; El-Kohuen et al., 1999). Así, la transmisión opiodérgica puede ser regulada también a través de la internalización mediada por receptores (disminuyendo el número de sitios (B_{max}) y/o la fosforilación y desensibilización de éstos.

2.6 Distribución de receptores a opioides.

Los receptores a opioides están ampliamente distribuidos en diversos tejidos tales como el nervioso, gástrico, inmune, etc (Sato and Minami, 1995; Shahabi et al., 1990; Lord et al., 1977). En el cerebro, el receptor μ se encuentra en altas densidades en regiones tales como los parches del estriado, el núcleo accumbens, la sustancia nigra compacta, etc y en bajas concentraciones en el ATV y 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 y en 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 (Mansour et al., 1988) (Tabla 6). El ARNm de los receptores a opioides se encuentra distribuido amplia y diferencialmente en el cerebro. La localización del ARNm del receptor μ , presenta un patrón muy parecido al de su proteína respectiva y generalmente en niveles cualitativamente similares. Sin embargo, algunas regiones donde no se ha detectado el receptor o está en niveles muy bajos muestran altas concentraciones de su ARNm (e.g. el núcleo central de la amígdala, el globo pálido, el área preóptica, el núcleo arcuato, el área hipotalámica lateral y el núcleo paraventricular del tálamo) (Sato and Minami, 1995). En el caso del ARNm del receptor δ y κ también hay grandes similitudes con la distribución de su receptor. No obstante, en el caso del ARNm del receptor δ algunas áreas del cerebro (globo pálido, núcleo ventromedial del hipotálamo, núcleos paraventricular y central medio del tálamo, etc) contienen concentraciones muy bajas o indetectables mientras que su proteína se expresa en

Tabla 6. Distribución de los receptores a opioides en el cerebro de la rata.

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

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

todas estas regiones y en algunos casos en altas densidades. El ARNm del receptor κ se encuentra en muy altas densidades en la SNc y el ATV; mientras que en el giro dentado del hipocampo no es detectable (Sato and Minami, 1995). La falta de concordancia entre la localización del ARNm y la del receptor sugiere que los receptores son sintetizados y transportados hacia las terminales las cuales se encuentran en una región distinta a la de la neurona que los produjo.

2.7 Funciones fisiológicas

Los péptidos opioides actúan como neuromoduladores ejerciendo una profunda influencia sobre diversos estados fisiológicos y patológicos, incluyendo funciones cardiovasculares, respiratorias y gastrointestinales. Los opioides también interactúan con el sistema neuroendócrino y son sensibles a diversos estresores. Asimismo, estos neuropéptidos 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).

A nivel del SNC los receptores a péptidos opioides generalmente están localizados presinápticamente y su activación disminuye la liberación de varios neurotransmisores y neuromoduladores, incluyendo GABA, acetilcolina, dopamina, norepinefrina, sustancia P, somatostatina, vasopresina y oxitocina (Xiao and Ye, 2008; Atweh y Kuhar, 1983; Berman et al., 1984). Varias de las funciones fisiológicas de los opioides explican cómo podrían estar modulando la liberación de los neurotransmisores (Simonds, 1988). Los opioides aumentan la corriente rectificadora entrante de potasio y disminuyen la conductancia del calcio dependiente de voltaje, hiperpolarizando las membranas neuronales, reduciendo la amplitud de los potenciales sinápticos y disminuyendo la tasa de disparo espontáneo de las neuronas (North et al., 1987; Simonds, 1988). Estas acciones se han observado en tejido nervioso central y periférico, y varían dependiendo de la región cerebral y del tipo neuronal. Ciertas conductancias iónicas pueden ser reguladas por subtipos individuales de receptores a opioides. Por ejemplo, los agonistas para receptores κ inhiben la conductancia de calcio dependiente de voltaje, mientras que los agonistas para receptores μ y δ activan

la corriente rectificadora entrante de potasio (Cherubini y North; 1985). Un sólo subtipo de receptor también puede interactuar con más de un sistema efector. Por ejemplo, en la línea celular híbrida de neuroblastoma X-glioma NG108-15, (la cual expresa solo el receptor δ), los opioides inhiben la adenilato ciclasa y la conductancia de calcio dependiente de voltaje (Hescheler et al., 1987). También se ha observado que la β -endorfina y la dinorfina inhiben la frecuencia de disparo de la mayoría de las neuronas del hipotálamo y esta inhibición es bloqueada por sus antagonistas (Lin y Pan, 1994).

2.8 Los péptidos opioides como mediadores del placer.

Los opiáceos ejercen efectos evidentes en el estado de ánimo y la motivación. En los humanos, éstos producen euforia y son utilizados como drogas de abuso. La administración de opiáceos a largo plazo resulta en el desarrollo de tolerancia y dependencia física (Herz, 1997). Inmediatamente después de la identificación de los péptidos opioides, se postuló que éstos podrían ser los mediadores de estados placenteros en el cerebro (Belluzzi y Stein, 1977). Diversas aproximaciones experimentales apoyan esta hipótesis. Una gran variedad de modelos animales, tales como la auto-administración intracraneal (AAIC), la auto-estimulación intracraneal (AEIC) y el paradigma de preferencia de lugar (PL), han sido empleados para determinar los efectos motivacionales de los opioides (Mucha y Herz, 1985; Herz, 1997). Este tipo de estudios muestran que los péptidos opioides producen reforzamiento o aversión, dependiendo del tipo de receptor que activen. En el modelo de PL se ha demostrado que la activación de los receptores μ produce preferencia al lugar asociado a la droga, mientras que la administración de U 50488 y U 69593 (agonistas del receptor κ) produce aversión al lugar (Mucha y Herz, 1985). La administración intracerebroventricular (ICV) de β -endorfina, así como la de DPDPE (agonista específico para receptores δ), produce preferencia de lugar, mientras que la administración de E-2078 (un derivado de la dinorfina) produce aversión (Herz, 1997). La aversión condicionada a un lugar también es producida por naloxona (antagonista opioide no selectivo) y CTOP (antagonista específico del receptor opioide μ) (Herz et al., 1992; para revisión). También se ha comprobado que las ratas se auto-administran

agonistas para receptores a opioides μ (DAMGO y morfina) y δ (DPDPE) en el ATV (Devine y Wise, 1994). Estos resultados muestran que la activación de los receptores a opioides μ y δ produce reforzamiento y que la disrupción de este sistema resulta en estados aversivos. En contraste, la activación de los receptores κ produce aversión.

En los primeros estudios realizados para investigar los mecanismos de reforzamiento de los péptidos opioides se sugirió que estos efectos se debían a la activación de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica, ya que el antagonista del receptor D1 SCH23390 (Shippenberg y Herz, 1988) y las lesiones con 6-OHDA (Spyraki, et al., 1983) en el NAcc atenuaban los efectos reforzadores de los opiáceos; la manipulación de este sistema puede abolir los efectos aversivos de la naloxona y del agonista a receptores κ U-69593 (Shippenberg y Herz, 1988).

2.9 Modulación de la actividad dopaminérgica por opioides.

Las regiones cerebrales que han sido asociadas a los mecanismos de reforzamiento a drogas de abuso contienen péptidos y receptores a opioides, en algunos casos en muy altas concentraciones. Estos péptidos modulan la actividad dopaminérgica de la vía mesolímbica. La administración ICV de agonistas a receptores a opioides μ y δ (DAMGO y DPDPE, respectivamente) aumenta la liberación de DA en el NAcc, mientras que la administración de agonistas a receptores κ (E-2078) la disminuye. Los efectos producidos sobre la liberación de DA debida a la activación de los receptores a opioides es prevenida por sus antagonistas (CTOP, ICI174, 864 y norbinaltorfimina para μ , δ y κ respectivamente) (Spanagel et al., 1990). La inyección directa de agonistas y antagonistas en las regiones de somas o terminales del sistema DAérgico mesolímbico afecta la liberación de DA y sus metabolitos en el NAcc: DAMGO en el ATV la aumenta, mientras que la de CTOP la disminuye; en cambio, la microinyección de estas sustancias en el NAcc no afecta la liberación de DA. En contraste, la administración de U-69593 (agonista del receptor κ) en el NAcc disminuye la liberación de DA, mientras que la de nor-BNI (antagonista del receptor κ) la aumenta; mientras que en el ATV no produce ningún efecto (Spanagel et al., 1992). Se ha sugerido que la activación de las neuronas DAérgicas en el ATV inducida por

agonistas de los receptores μ , se lleva a cabo a través de la inhibición de interneuronas GABAérgicas. Numerosas evidencias apoyan esta hipótesis: 1) La lesión del ATV por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no afecta significativamente ni la densidad ni la distribución del receptor opioide μ (Dilts y Kalivas, 1989). Además, estudios más recientes confirman que la mayoría de los receptores a opioides μ en el ATV están localizados sobre neuronas no DAérgicas (Garzón y Pickel, 2001), las cuales probablemente sean GABAérgicas; 2) La administración de morfina en el ATV disminuye la concentración de GABA extracelular e incrementa la de DA (Klitenick et al., 1992); 3) Neuronas DAérgicas del ATV electrofisiológicamente identificadas son inhibidas por DA y no responden a péptidos opioides (Johnson y North, 1992a); 4) El agonista de receptor μ DAMGO silencia a las neuronas GABAérgicas del ATV e inhibe las corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSCs) registradas en neuronas DAérgicas (Xiao and Ye, 2008). Estos estudios sugieren que el incremento en la liberación de DA en el NAcc 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 dopaminérgicos del ATV (Johnson y North, 1992 a y b). Cabe mencionar que otros neurotransmisores también podrían participar de manera importante en la regulación de la actividad de las neuronas DAérgicas del ATV (i.e. glutamato, purinas y dopamina) (Xiao et al., 2008 and Xiao et al., 2009).

Los receptores a opioides también actúan en las terminales de las neuronas dopaminérgicas regulando su actividad (Spanagel et al., 1992; Herz, 1997). El receptor δ en la cubierta del NAcc modula la liberación presináptica de neurotransmisores principalmente inhibitorios (Svingos et al, 1998), mientras que la activación del receptor κ inhibe las neuronas glutamatérgicas (Hjelmstad y Fields, 2001). Así, la regulación de la liberación de DA en el NAcc podría llevarse a cabo mediante mecanismos similares al del ATV.

Indudablemente los péptidos opioides juegan un papel crucial en la regulación de la actividad de la vía DAérgica mesolímbica lo cual tiene implicaciones trascendentales en el contexto de los mecanismos neurales de reforzamiento de las drogas de abuso como se verá más adelante.

III. El sistema opioide y el alcohol.

3.1. Papel de los péptidos opioides en la adquisición y el mantenimiento de la conducta de alto consumo de alcohol.

El etanol activa al sistema opioide endógeno y se ha postulado que los cambios neuroadaptativos resultantes en este sistema son esenciales en la adquisición y mantenimiento de la dependencia al alcohol. La administración de naltrexona (antagonista no selectivo de receptores a opioides) atenúa la adquisición del comportamiento de consumo de alcohol (Phillips et al., 1997; Davidson et al., 1997). Además, diversas especies de animales responden similarmente a la administración de antagonistas no selectivos para receptores a opioides tales como la naloxona, la naltrexona y el namelfeno, así como a la de antagonistas selectivos para receptores μ y δ disminuyendo el consumo de alcohol de manera dosis dependiente (Herz, 1997; Myers et al., 1986; Froehlich et al., 1990; Froehlich et al., 1991; 1993; June et al., 1998; Hyytia, 1993; Krishnan-Sarin et al., 1995; Honkanen et al., 1996). En el humano, la naltrexona (ReVia), combinada con terapia conductual, reduce el consumo de alcohol así como la ansiedad por beber y las recaídas (Volpicelli et al., 1992; O'Malley, 1996). La efectividad del tratamiento del alcoholismo con naltrexona depende de un polimorfismo del receptor μ donde una Asparagina (Asn) es sustituida por Aspartato (Asp) en la posición 40 de la cadena de residuos de aa del receptor. Esta sustitución produce un cambio estructural en el dominio extracelular del receptor el cual muestra un aumento en la unión a la β -END así como en su actividad funcional in vitro (Bond et al., 1998). Anton y colaboradores (2008) encontraron que la mayoría (81.7%) de los individuos heterocigotos (Asp40/Asn40) del gen del receptor μ responden exitosamente al tratamiento con naltrexona, mientras que solo la mitad (54.8%) de los individuos homocigotos (Asp40/Asp40) lo hacen. Los agonistas opioides modifican el consumo de alcohol dependiendo de la dosis administrada y de la previa exposición a éstos (Ho y Chen, 1976; Barson et al., 2009). Por ejemplo, la administración de agonistas opioides en el NAcc, tales como morfina y DAla-Gly-Phe-Met-NH₂ (DALA), aumenta el consumo de etanol (Barson et al., 2009). Los inhibidores de la degradación

de encefalinas, también incrementan el consumo voluntario de alcohol (Blum et al., 1987; Hyytiä, 1993). En resumen, la activación de los receptores a opioides μ y δ es importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol tanto en el periodo de adquisición de la conducta de consumo de la droga, como en la fase de dependencia.

3.2. Modelos animales de alcoholismo y sistema opioide endógeno.

Los roedores cruzados selectivamente dependiendo de su preferencia por el alcohol (Eriksson, 1968; Lumeng y Li, 1986; Fadda et al., 1990; Sinclair et al., 1996) y de su manera específica de responder a la exposición aguda y crónica al alcohol (Crabbe et al., 1987; Kosobud y Crabbe, 1986; Crabbe y Kosobud, 1986) se han utilizado para investigar las bases neuroquímicas y neurofisiológicas de las conductas relacionadas con el consumo del alcohol (e.g. la preferencia por la droga, la activación locomotora, la narcosis y la hipotermia inducidas por esta). En la tabla 7 se muestran algunos ejemplos.

El sistema opioide endógeno de los roedores que prefieren alcohol no presenta un patrón general de comportamiento basal o de respuesta a la droga. Sin embargo, vale la pena examinar algunas hipótesis que se han planteado al respecto. Se ha propuesto que existe una relación entre un riesgo elevado de alcoholismo y niveles basales bajos de péptidos opioides (Gianoulakis et al., 1989; Zalewska-Kaszubska and Czarnecka, 2005). Las ratas AA presentan una liberación espontánea hipotalámica de β -endorfina menor que las ratas ANA (De Waele et al., 1994). Los niveles basales de Met-encefalina son más bajos en el NAcc de las ratas AA que las ANA (Nylander et al., 1994) y en el hipotálamo de los ratones C57BL/6 (que prefieren alcohol) que en el de los DBA/2 (que evitan la droga) (Blum y Briggs, 1988). En el caso del sistema β -endorfinérgico se han reportado resultados similares en humanos. Los individuos que son hijos de padres alcohólicos muestran una actividad opioidérgica hipotalámica disminuída en comparación con los hijos de no alcohólicos (Wand et al., 1998). Además, los humanos con alto riesgo de alcoholismo tienen niveles basales bajos de β -endorfina plasmática en comparación con los individuos con bajo riesgo de alcoholismo (Gianoulakis et al., 1989). En conclusión, deficiencias en los sistemas

opioidérgicos (en varios casos específicos dependiendo de la región) podrían predecir una vulnerabilidad aumentada a desarrollar la conducta de alto consumo de alcohol.

Tabla 7. Líneas de roedores seleccionados por su preferencia, consumo y respuestas a los efectos del alcohol.

Líneas	Rasgo de selección
Ratas que prefieren alcohol ("Preferring") (P) y que no lo prefieren ("Non-preferring") (NP)	Preferencia por el alcohol.
Ratas "ALKO alcohol" (AA) y "ALKO non-alcohol" (ANA)	
Ratas "High-alcohol drinking" (HAD) y "Low-alcohol drinking" (LAD)	
Ratas "High-ethanol preferring" (HEP) y "Low-ethanol preferring" (LEP)	
Ratones "Long sleep" (LS) y "Short sleep" (SS)	Efecto anestésico del alcohol demostrado por la duración de la pérdida del reflejo de rectificación.
Ratones "FAST" y "SLOW"	Actividad estimulada por alcohol.
Ratones propensos "Withdrawal seizure prone" (WSP) y resistentes "Withdrawal seizure resistant" (WSR) a las convulsiones producidas por la abstinencia.	Severidad de las convulsiones durante el síndrome de abstinencia.
Ratones "COLD" y "HOT"	Intensidad de la hipotermia inducida por alcohol.

Adaptado de Gianoulakis, 2001.

Por otra parte, también se ha sugerido que un sistema opioide altamente responsivo al alcohol está asociado a un alto riesgo de alcoholismo (Gianoulakis et al., 1989; De Waele et al., 1992). El alcohol aumenta la liberación de β -endorfina del hipotálamo y este efecto es significativamente mayor en los ratones que prefieren la droga (C57BL/6) en comparación con los que la evitan (DBA/2) (De Waele et al., 1992). El ARNm de Met-enkefalina aumenta significativamente después de la administración de una dosis aguda de alcohol en el NAcc de las ratas P, pero no en el de las NP (Li et al., 1998). En las ratas AA el tratamiento crónico con etanol incrementa los niveles de Met-enkefalina-Arg6-Phe7, en comparación con las ratas ANA (Nylander

et al., 1994). En el humano se ha observado que el alcohol produce un incremento de la concentración de la β -endorfina plasmática y que este cambio es mayor en los individuos con alto riesgo de alcoholismo que en los individuos con bajo riesgo (Gianoulakis et al., 1989).

También se han encontrado diferencias en la densidad de los receptores a opioides al comparar los animales que prefieren y los que evitan el alcohol. Estas diferencias se han detectado en diversas regiones del cerebro, incluyendo aquellas que están involucradas en los procesos de reforzamiento y recompensa de drogas de abuso (De Waele et al., 1995; Jamensky y Gianoulakis, 1997; De Waele y Gianoulakis, 1997). Se encontró que las ratas AA en comparación con las ANA presentan una mayor densidad de receptores a opioides μ en la cubierta del NAcc y en la corteza prefrontal, pero una menor densidad del receptor κ en el hipotálamo ventromedial (Marinelli et al., 2000). De Waele y colaboradores (1995) reportaron una densidad más alta de receptores δ en el NAcc de las ratas AA en comparación con las ANA. Los ratones C57BL/6 en comparación con los DBA/2 tienen más altas densidades del receptor δ y más bajas del κ en el NAcc (Jamensky y Gianoulakis, 1997; De Waele y Gianoulakis, 1997). El receptor opioide μ se presenta en densidades más altas en el NAcc y los parches del estriado, entre otras regiones del cerebro de las ratas P en comparación con el de las NP (McBride et al., 1998). De manera interesante, los roedores que prefieren alcohol presentan altos niveles de receptores μ y/o δ en regiones tales como el NAcc, lo cual podría contribuir de manera importante en los efectos reforzadores del alcohol.

Bajos niveles basales de péptidos opioides, una sensibilidad incrementada del sistema opioide al alcohol y altos niveles de receptores μ y/o δ en el NAcc son características presentes en el cerebro de los roedores seleccionados para preferir alcohol, y probablemente también en el de los humanos con alto riesgo de desarrollar alcoholismo. Así, el alcohol podría tener un efecto particularmente reforzador en individuos con estos antecedentes genéticos. En este contexto, el alcohol estimularía la liberación de β -endorfina y de encefalinas, los cuales van a activar los receptores μ

y δ en regiones como el NAcc, estimulando a su vez, la actividad de la vía de reforzamiento (Gianoulakis, 2001).

Por otro lado, independientemente de la interacción opioides-DA, los niveles incrementados de β -endorfina durante la actividad física o en estados alterados de la conciencia han sido asociados con un mejor estado de ánimo y un sentimiento generalizado de bienestar (Akil et al., 1984), lo cual sugiere que el incremento de β -endorfina inducido por alcohol en individuos con historia familiar de alcoholismo puede tener un significado reforzador importante.

Estudios realizados en ratones transgénicos que no expresan ciertos elementos del sistema opioide también aportan datos interesantes en este contexto y proporcionan nuevas evidencias de la trascendencia de sistema opioide en la conducta de un alto consumo de alcohol. Los ratones “knock-out” de β -endorfina, e incluso los que expresan la mitad de los niveles normales de este péptido, se auto-administran (de manera oral o intravenosa) cantidades significativamente mayores de etanol que los ratones intactos (Grisel et al., 1999). Por otro lado, el ratón “knock-out” de receptor δ opta por beber alcohol y presenta un alto consumo de esta droga en comparación con los ratones intactos (Roberts et al., 2001). El ratón C57BL/6, normalmente prefiere beber alcohol, pero cuando se le inhibe la expresión del receptor μ (knock-out del receptor) exhibe menor preferencia por la droga en comparación con los ratones control (Roberts et al., 2000). De hecho, el consumo de la sustancia en estos animales (C57BL/6 knock-out del receptor μ) es similar al observado en los ratones de la cepa DBA/2J, los cuales evitan el alcohol (Belknap et al., 1993; Risinger et al., 1998).

Evidentemente el alcoholismo es un desorden multifactorial donde la expresión de predisposición genética a este será influenciada por factores ambientales específicos (Cloninger et al., 1985). Sin embargo, los estudios mencionados anteriormente indican que diferencias genéticas en los sistemas de péptidos opioides podrían ser determinantes de la preferencia por el alcohol y la conducta de un alto consumo de la droga observada en los roedores que prefieren alcohol e individuos alcohólicos.

3.3. Efecto del alcohol sobre el sistema opioide endógeno.

3.3.1 Sistema β -endorfinérgico.

Efecto de la administración aguda de alcohol.

La exposición de tejido hipotalámico e hipofisiario a etanol in vitro estimula la liberación de β -endorfina de manera dependiente de la dosis (de Waele et al., 1992; Keith et al., 1986, Gianoulakis, 1990; de Waele y Gianoulakis, 1993). En el hipotálamo, concentraciones “bajas” de etanol (20 mM) inducen un incremento más pronunciado en la liberación de la β -endorfina que las concentraciones altas (60, 120 mM) (de Waele et al., 1992; Gianoulakis, 1990; Gianoulakis et al., 1989). Estudios in vitro muestran que el etanol (17 and 20 mM) aumenta rápidamente la liberación de β -endorfina hipofisiaria e hipotalámica (durante 15 a 20 minutos), y posteriormente regresa a los niveles basales (Keith et al., 1986; de Waele y Gianoulakis, 1993). Desafortunadamente, las concentraciones de etanol utilizadas en estos estudios no son representativas de las que se alcanzan fisiológicamente. Por ejemplo, la administración de 2 g/kg de etanol produce concentraciones de hasta 8 mM en el NAcc de la rata (Yim et al., 2000). Así, la administración de alcohol in vivo no afecta la liberación del péptido en los núcleos arcuatos del hipotálamo, pero sí en otras regiones tales como el NAcc, la amígdala central y el mesencéfalo/ATV (Olive et al., 2001, Marinelli et al., 2004, Lam et al., 2008, Jarjour et al., 2009). El aumento en la liberación de β -endorfina en estas regiones es transitoria y dependiente de la dosis (Marinelli et al., 2003, Lam et al., 2008, Jarjour et al., 2009). En el mesencéfalo/ATV, dosis de etanol de 1.2, 1.6 y 2 g/kg (i.p.) aumentan la liberación de β -END 1, 0.5 y 2.5 h después de la administración (respectivamente para cada dosis); esta se mantiene elevada hasta 3.5 o 4 h después. La administración de alcohol (2.4 g/kg) también aumenta la liberación del péptido en el NAcc 90 min después de la administración (Marinelli et al., 2003; 2004).

La administración aguda de etanol también altera el contenido de la β -END diversas regiones del cerebro. Se ha reportado que la administración de una dosis aguda de etanol puede incrementar (Schulz et al., 1980; Patel and Pohorecky, 1989;

Anwer and Soliman, 1995), disminuir (Przewlocka et al., 1990) o no alterar (Seizinger et al., 1983; Rasmussen et al., 1998) los niveles de β -END hipotalámica en ratas Wistar o Sprague Dawley. Las dosis de etanol utilizadas en estos estudios van de 0.91 a 5 g / kg y fueron administradas por vía intraperitoneal (i.p.) o intragástrica (i.g.). Sin embargo, estas diferencias no explican las discrepancias encontradas entre los distintos resultados publicados (Tabla 8). También se ha estudiado el efecto del alcohol sobre algunas regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. La administración de una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg i.p.) en ratas Sprague Dawley no altera el contenido de β -END en el mesencéfalo (Seizinger et al., 1983). Sin embargo, una dosis más alta (3 g/kg i.p.) en ratas Wistar lo aumenta (Anwer and Soliman, 1995). Estos últimos autores también estudiaron el efecto de la droga sobre el contenido del péptido en la corteza frontal y no detectaron ningún cambio. Rasmussen y colaboradores (1998) investigaron el efecto de la exposición al alcohol a corto plazo en el NAcc y la VTA. Las ratas utilizadas en este estudio fueron introducidas gradualmente a la droga y se les administró una dosis baja de alcohol en el primer día (0.91 g/kg), una dosis media en el segundo día (1.33 g/kg), salina en el tercer día y en el cuarto día se llevó a cabo la administración de diversas dosis de etanol y se midió el contenido de β -END en el NAcc, la VTA, la amígdala y varias regiones del hipotálamo. Encontraron que la dosis de 1.68 g/kg de etanol (i.g.) aumenta el contenido del péptido en el NAcc y la VTA 30 min después de la administración. En esta última región, una dosis media de etanol (1.33 g/kg) también aumentó el contenido de β -END (Rasmussen et al., 1998). Cabe mencionar que en este estudio se utilizó un anticuerpo con una reactividad cruzada del 60% contra la β -lipotropina porcina, por lo que los cambios observados podrían deberse, al menos parcialmente, al aumento de este neuropéptido. El etanol también altera el contenido del péptido en otras regiones del cerebro, tales como el hipocampo, y el tálamo, pero no tiene efecto en la médula/puente (Anwer and Soliman, 1995; Iukhananov et al., 1983) (Tabla 8). Iukhananov y colaboradores (1983) estudiaron el efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -END del cerebro de ratas con baja y alta sensibilidad a los efectos narcóticos de la droga ("short" y "long-sleepers" respectivamente). Los short-sleepers consumen cantidades significativamente más

altas de alcohol que los long-sleepers (Burov et al., 1981). La narcosis inducida por alcohol se determinó inyectando 4.5 g/kg de etanol (i.p.) y cuantificando el tiempo que la rata permanecía sedada (short-sleepers 85 ± 9 min y long-sleepers 192 ± 15 min).

Tabla 8. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -endorfina en el cerebro de la rata.

<i>Dosis (g/kg) y vía de administración</i>	<i>Cepa</i>	<i>Tiempo después de la administración</i>	<i>Región</i>	<i>Efecto</i>	<i>Referencia</i>
2 i.g.	Sprague Dawley	1 h	Hipotálamo	↑	Patel y Pohorecky, 1989
2.5 i.p.	Sprague Dawley	20 min y 1h		↑	Schulz et al., 1980
3 i.p.	Wistar	1 h		↑	Anwer and Soliman, 1995
2.5 i.p.	Sprague Dawley	1 h		-	Seizinger et al., 1983
5 i.g.	Wistar	30 min		↓	Przelowcka et al., 1990
2.5 i.p.	Sprague Dawley	1 h	Mesencéfalo	-	Seizinger et al., 1983
3 i.p.	Wistar	1 h		↑	Anwer and Soliman, 1995
3 i.p.	Wistar	1 h	Corteza frontal	-	
2.5 i.p.	short-sleepers *	1 h	Corteza	-	lukhananov et al., 1983
	long-sleepers *	1 h		↑	
3 i.p.	Wistar	1 h	Hipocampo	↑	Anwer and Soliman, 1995
2.5 i.p.	short-sleepers *	1 h	Estriado	↑	lukhananov et al., 1983
	long-sleepers *	1 h		-	
2.5 i.p.	short-sleepers *	1 h	Tálamo	↓	lukhananov et al., 1983
	long-sleepers *	1 h		↓	
2.5 i.p.	short-sleepers *	1 h	Medula + Puente	-	lukhananov et al., 1983
	long-sleepers *	1 h		-	

*A partir de la misma cepa de ratas albinas se seleccionaron 2 grupos dependiendo de su sensibilidad a la narcosis inducida por alcohol y fueron nombradas short-sleepers y long-sleepers, para la baja y alta sensibilidad respectivamente. Quince días después se administró etanol o solución salina y se midieron los niveles de β -END. En el texto se detalla la metodología empleada en este estudio.

Quince días después se llevó a cabo la administración de etanol (2.5 g/kg) o solución salina y la cuantificación de β -END en diversas regiones del cerebro. En algunos casos el efecto del alcohol sobre el contenido del péptido no difiere entre estos dos grupos de ratas (Tabla 8). Sin embargo, en la corteza se presenta un aumento significativo en los niveles de la β -END solo en las long-sleepers, en cambio en el estriado el contenido del péptido aumenta solo en las short-sleepers (Tabla 8).

En general, la administración aguda de etanol (dosis entre 0.91 - 3 g/kg) aumenta el contenido del péptido en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas. Este efecto se observa también después de la exposición corta a la droga (3 días). Evidentemente existen algunas excepciones, caso notable de esto es el tálamo en el cual se observa el efecto opuesto. Además, en regiones específicas algunas cepas responden a la droga mientras otras no (i.e. Sprague Dawley vs Wistar en el mesencéfalo). Incluso en roedores de la misma cepa seleccionados por su sensibilidad a la narcosis inducida por alcohol se presentan cambios en uno u otro grupo dependiendo de la región (i.e. el estriado y la corteza). Por otro lado, dosis muy altas de etanol (5 g/kg) indujeron un rápido descenso en la β -endorfina hipotalámica.

También se ha estudiado el efecto del alcohol sobre el ARNm de la POMC. Popp y Erickson (1998) mostraron que una dosis aguda de etanol (0.5, 1 o 3 g/kg) no afecta los niveles de los transcritos primario y maduro del ARN de POMC hipotalámico. Los tiempos estudiados fueron 0.25, 0.5, 1 o 4 h después de la administración. Rasmussen y colaboradores (1998) investigaron el efecto de una exposición de alcohol a corto plazo utilizando el protocolo descrito arriba, donde las ratas fueron expuestas gradualmente a la droga y posteriormente se les administraron 3 diferentes dosis de alcohol, las cuales fueron seguidas por 4 infusiones más. Esto último se llevó a cabo con el objetivo de mantener constante en nivel de alcohol en sangre durante más de 3 horas. Así, la administración de 1.68 g/kg de etanol seguida por 0.28 (dos veces) y 0.25 (dos veces) g/kg cada 30 min indujo un aumento en los niveles del ARNm de POMC en la región medio-basal del hipotálamo a las 3 y 6 h. No encontraron efecto a los 30 min y 1 hora después de la administración inicial de alcohol. La administración de 0.91 y 1.33 g / kg de etanol no alteró los niveles de ARNm de POMC en ningún tiempo estudiado. En contraste, Zhou y colaboradores (2000) encontraron que la

administración de 1.5 g/kg (3 veces a intervalos de una hora) durante un día disminuye los niveles de ARNm de POMC en el hipotálamo. En general la exposición de alcohol a corto plazo activa al sistema β -endorfinérgico, aumentando el contenido y la liberación del péptido y alterando también los niveles de ARNm de POMC. Estos cambios son diferenciales dependiendo del área, la dosis y el tiempo transcurrido después de la administración. Se ha sugerido que están relacionados con el reforzamiento positivo que produce la droga contribuyendo a la iniciación en la conducta de un alto consumo de alcohol.

Efecto de la administración crónica de alcohol.

La exposición al alcohol durante 2 semanas no altera (Zhou et al., 2000) o aumenta (Angelogianni and Gianoulakis, 1993) los niveles del ARNm de POMC en el hipotálamo. En contraste, el consumo de etanol durante 7 semanas los disminuye (Rasmussen et al., 2002).

A pesar de que se han realizado numerosos estudios de los efectos de la administración crónica de etanol sobre el contenido de la β -endorfina hipotalámica, los resultados son inconsistentes. Se ha reportado que la exposición prolongada al alcohol puede aumentar (Patel and Pohorecky, 1989; Przelowcka et al., 1990; Boyadjieva et al., 2001), no alterar (Schulz et al., 1980; Seizinger et al., 1983) o incluso disminuir (Boyadjieva et al., 2001) los niveles del péptido en el hipotálamo. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en los tiempos de exposición, las dosis utilizadas, las disecciones de las áreas cerebrales y la cepa de roedor utilizada en el estudio. En algunos estudios es evidente el desarrollo de tolerancia a la droga, presentándose inicialmente un aumento en los niveles del péptido después de una semana de tratamiento y, posteriormente, una disminución a las 2, 3 y 4 semanas de exposición (Boyadjieva et al., 2001). El efecto del alcohol durante periodos de tiempo largos también se ha estudiado en otras regiones del cerebro tales como el mesencéfalo (Seizinger et al., 1983), la médula + puente, la corteza, el tálamo y el estriado (Iukhananov et al., 1983). Cuando la exposición a la droga es de 10 meses, se produce

una disminución en el contenido de beta-endorfina en la corteza y la médula + puente, mientras que en el tálamo se observa un aumento (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto del tratamiento crónico con alcohol in vivo sobre el contenido de β -endorfina en el cerebro de la rata.

<i>Dosis (g/kg) / Concentración de etanol (%)</i>	<i>Forma o vía de administración</i>	<i>Cepa</i>	<i>Duración</i>	<i>Región</i>	<i>Efecto</i>	<i>Referencia</i>
5 a 10 g/kg -	i.g.	Wistar	6 días	Hipotálamo	↑	Przelowcka et al., 1990
8 g/kg a 11 g/kg -	i.g.	Sprague Dawley	10 días		↑	Patel y Pohorecky, 1989
- 8.7 %	En dieta líquida	Fischer	1 semana 2, 3 y 4 semanas		↑ ↓	Boyadjieva et al., 2001
15 g/kg/día 7%	En dieta líquida	Sprague Dawley	2 semanas		-	Seizinger et al., 1983
- 1, 5 y 20%	En el agua para beber	Sprague Dawley	6, 14 y 30 días		-	Schulz et al., 1980
15 g/kg/día 7%	En dieta líquida	Sprague Dawley	2 semanas	Mesencéfalo	-	Seizinger et al., 1983
- 15%	Auto-administración voluntaria (paradigma de libre elección)	Heavy drinkers	3 meses	Corteza	-	Iukhananov et al., 1983*
			10 meses		↓	
		Light drinkers	3 meses		-	
			10 meses		-	
		Heavy drinkers	3 meses	Estriado	-	
			10 meses		-	
		Light drinkers	3 meses		-	
			10 meses		-	
		Heavy drinkers	3 meses	Tálamo	↑	
			10 meses		-	
		Light drinkers	3 meses		-	
			10 meses		-	
Heavy drinkers	3 meses	Médula + Puente	-			
	10 meses		↓			
Light drinkers	3 meses		-			
	10 meses		-			

* Iukhananov y colaboradores (1983) dividieron ratas albinas en 2 grupos dependiendo de su consumo voluntario de etanol: 1) Los roedores que consumieron preferentemente la solución de etanol (15 %) específicamente: un mínimo del 70% del líquido total bebido a los que llamaron "Heavy drinkers" y 2) Los roedores que consumieron como máximo de solución de alcohol el 10% del volumen total "Light drinkers".

Al igual que la exposición aguda al alcohol, la administración de alcohol a corto plazo (6-10 días) induce un aumento en el contenido de β -END hipotalámica; sin embargo, cuando la duración del tratamiento es de 2 semanas o mayor se ha reportado que no hay efecto o que se produce una disminución en los niveles del péptido. Otras regiones también presentan disminuciones significativas en los niveles del péptido después de 10 meses de consumo voluntario de alcohol (i.e. corteza y médula + puente) (Tabla 9). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la exposición crónica al alcohol disminuye la actividad del sistema beta-endorfinérgico (Richardson et al., 2008; Zalewska-Kaszubska y Czarnecka, 2005); lo cual podría promover y mantener el consumo de alcohol a través de mecanismos de reforzamiento negativo.

3.3.2 Efectos del alcohol sobre los sistemas de encefalinas y dinorfinas.

La exposición al etanol altera también los sistemas encefalinérgico y dinorfinérgico. El etanol modifica los niveles de los RNAm que dan origen a los precursores de encefalinas (Pro-Enk) y dinorfinas (Pro-Din). El tratamiento agudo con alcohol (2.5 g/kg) altera diferencialmente la expresión del ARNm de Pro-Enk dependiendo de la región estudiada y del tiempo transcurrido después de la administración. Este tratamiento produjo un aumento en los niveles del ARNm en el estriado (1 y 2 h), la CPF (4h) y el NAcc, área central (1 a 8 h) y la cubierta (2 a 8h). En contraste, la administración aguda de alcohol indujo una disminución del ARNm en otras regiones del cerebro (SN y ATV 2h después de la administración) (Méndez and Morales-Mulia, 2006; Méndez et al., 2008). El tratamiento agudo con alcohol aumenta los niveles del ARNm de las dinorfinas en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Chang et al., 2007). En contraste, el tratamiento crónico con alcohol aumenta los niveles del ARNm de encefalinas en el NPV del hipotálamo, la VTA, el NAcc, la CPFm y la amígdala central (ACe) y el de dinorfina en el NPV del hipotálamo, la CPFm y la ACe (Chang et al., 2010).

La administración de una dosis aguda de etanol (1.2 g/kg) aumenta la liberación de dinorfina 1-8 en el mesencéfalo pero no la de Met-enkefalina (Jarjour et al., 2009).

En el NAcc, dosis de etanol de 1.6 y/o 3.2 g/kg aumentan la liberación de ambos péptidos en ratas Sprague Dawley en libre movimiento (Marinelli et al., 2005; Marinelli et al., 2006). Estudios realizados en ratas Wistar anestesiadas también muestran un aumento en la liberación de Met-enk en este núcleo en respuesta a la administración i.p. de alcohol (0.5, 1 y 2.5 g/kg) aunque con patrones cinéticos diferentes (Méndez et al., 2010). En la amígdala central, 2.8 g/kg de alcohol aumenta la liberación de dinorfina 1-8, pero no de Met-enkefalina (Lam et al., 2008). El tratamiento agudo con alcohol también afecta el contenido de Met-enkefalina en diversas regiones del cerebro, tales como el hipotálamo, el estriado y el mesencéfalo, mientras que el contenido de dinorfina en estas regiones no es alterado (Seizinger et al., 1983; Schulz et al., 1980). Estudios más recientes muestran que una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg) disminuye el contenido de Met-enk en el NAcc y el caudado-putamen de ratas Wistar (Méndez et al., 2010.) La exposición crónica al etanol induce una disminución en los niveles de Met-enkefalina en la médula + puente, el hipotálamo, el estriado y el mesencéfalo. En el caso de la dinorfina 1-13 este tipo de tratamiento aumenta los niveles del péptido en el NAcc, el hipotálamo y el hipocampo y los disminuye en la corteza cingular (Lindholm et al., 2000; Seizinger et al., 1983). Gustafsson y colaboradores (2007) demostraron que ciertos factores ambientales durante el desarrollo de las ratas (i.e., la separación maternal durante 15 o 360 min por día) podían modificar los niveles de Met-enkefalina-Arg-Phe (MEAP) en diversas regiones del cerebro, pero no los de dinorfina B. Además, en estas ratas el efecto del consumo crónico de alcohol modifica diferencialmente el contenido de MEAP, pero no el de dinorfina B. Así, en las ratas con separación maternal de corta duración la exposición a largo plazo al etanol disminuye los niveles de MEAP en la corteza prefrontal medial (CPFm) y la sustancia gris periacueductal. En cambio, en las ratas que fueron sometidas a separación maternal de larga duración los niveles de este péptido aumentan en el hipotálamo, el estriado y la sustancia nigra (SN). El contenido de dinorfina B fue alterado en la hipófisis, el hipotálamo y la SN de manera similar en ambos tipos de ratas (Gustafsson et al., 2007). Así, eventos estresantes durante el desarrollo de los roedores pueden modificar significativamente la respuesta algunos péptidos opioides al alcohol (Gustafsson et al., 2007).

En conclusión, el efecto del alcohol sobre los sistemas de encefalinas y dinorfinas es distinto dependiendo de la dosis administrada, el tiempo transcurrido después de la administración y el tiempo de exposición a la droga así como, de la región estudiada.

Los cambios inducidos por el alcohol en estos sistemas opioidérgicos podrían estar relacionados con los efectos reforzadores (positivos y negativos) del alcohol. Los sistemas encefalinérgico y dinorfinérgico podrían participar de manera opuesta en el establecimiento de la adicción al etanol, ya que la liberación de encefalinas y la subsecuente activación de los receptores μ y δ estimulan la vía dopaminérgica mesocorticolímbica y, por lo tanto, el circuito de la recompensa, mientras que la liberación de dinorfinas seguida por la activación de los receptores κ tiene el efecto contrario. Además, se ha hipotetizado que el tratamiento crónico con alcohol induce una deficiencia del sistema encefalinérgico acompañada por una hiperactividad del sistema dinorfinérgico, lo cual podría contribuir a la conducta de un alto consumo de alcohol a través de mecanismos de reforzamiento negativo (Gianoulakis, 2004).

3.3.3 Efectos del alcohol sobre los receptores a opioides.

La administración de una dosis aguda de etanol in vivo afecta diferencialmente la unión de DAMGO y DPDPE en el cerebro de rata, dependiendo del tiempo transcurrido después de la administración y de la región estudiada. La administración intragástrica de una dosis de 2.5 g/kg de etanol disminuye la unión de DAMGO, en el ATV, el NAcc y la SN, mientras que en la corteza frontal y prefrontal aumenta la unión del ligando al receptor μ (Méndez et al., 2001; Méndez et al., 2003). En el caso del DPDPE el mismo tratamiento produce un aumento en la unión del ligando en la corteza frontal y prefrontal, la SN y en las regiones anterior y media del estriado, así como en el NAcc. En contraste, en la parte posterior del estriado se presenta un decremento en la unión del ligando (Méndez et al., 2004). Otros estudios muestran que una dosis de 2 g/kg de etanol (i.p.) aumenta la unión de DAMGO en regiones tales como la cubierta del NAcc y la amígdala basolateral, entre otras, y que no afecta la unión de deltorfina en prácticamente ninguna región del cerebro una hora después de la administración

(Rosin et al., 2003). Las variaciones en los resultados podrían estar relacionadas con la respuesta diferencial en la liberación de beta-endorfina y encefalinas a distintas dosis y cursos temporales. En relación a los receptores kapa, la administración aguda de etanol (2 g/kg i.p.) induce un aumento de la unión de C1977 en el área preóptica y una disminución en la amígdala medial (Rosin et al., 2003). Estos estudios sugieren que la activación de receptores a opioides podría formar parte de los mecanismos de reforzamiento en las etapas tempranas de la conducta de consumo de alcohol.

Los efectos de la exposición crónica al alcohol sobre la unión de ligandos opioides a sus receptores también han sido explorados. En ratas Wistar la exposición crónica al alcohol induce una regulación negativa del receptor μ en el NAcc y en el estriado, pero no tiene efecto sobre los receptores a opioides $\delta 1$ y $\delta 2$ (Turchan et al., 1999). Adicionalmente, el tratamiento crónico con alcohol afecta el acoplamiento de las proteínas G a los receptores a opioides μ , como se ha demostrado en la CPF y regiones específicas del colículo superior e inferior y del giro dentado (Sim-Selley et al., 2002; Saland et al., 2004). El consumo voluntario de etanol (durante 26 días) altera la unión de deltorfina y C1977 en diversas regiones del cerebro lo cual depende, en algunos casos, de los niveles de estrés experimentados en los primeros 21 días postnatales. Así, el consumo de alcohol induce una disminución de la unión del ligando al receptor δ en las capas superficiales de la corteza de roedores sometidos a una separación maternal de corta duración, sin modificarla en aquellos que fueron sometidos a una separación maternal por periodos prolongados (Ploj et al., 2003). En el caso del receptor κ el consumo crónico de alcohol induce una disminución de la unión de C1977 en diversas regiones del cerebro de los roedores sometidos a una separación maternal de corta duración (e.g. capas profundas de la corteza occipital, tálamo, hipocampo, colículo superior) mientras que en los roedores sometidos a separación maternal de larga duración no hay efecto (Ploj et al., 2003). En conclusión, la exposición prolongada al alcohol altera la unión a receptores δ y κ de manera diferencial dependiendo de la duración de tratamiento, la región estudiada, el nivel de estrés experimentado durante la etapa postnatal, etc.

En resumen, el consumo de alcohol induce cambios en la transmisión opioidérgica produciendo alteraciones en el contenido y liberación de los péptidos, en

los niveles de sus precursores y receptores, etc., tanto en las etapas iniciales de consumo de la droga como a largo plazo y estos cambios podrían estar asociados con las propiedades de reforzamiento positivo y negativo de la droga.

Planteamiento del problema.

El sistema β -endorfinérgico y los receptores μ son importantes en los mecanismos de reforzamiento del alcohol. Estudios realizados en roedores seleccionados por su preferencia al alcohol indican que existen modificaciones genéticas en este sistema que podrían estar relacionadas con la preferencia innata por la droga. Además, la administración de alcohol induce un aumento en la liberación de β -END hipotalámica en los roedores que prefieren alcohol que es significativamente mayor a la producida en aquellos roedores que no prefieren la droga (De Waele et al., 1992). La activación de los receptores μ también es crucial en los mecanismos de reforzamiento del alcohol; antagonistas selectivos (e.g. la β -funaltrexamina) y no selectivos de receptores a opioides disminuyen el consumo voluntario de la droga en ratas que prefieren alcohol (Stromberg et al., 1998). Asimismo, el alcohol modifica la actividad β -endorfinérgica de manera diferencial, dependiendo de la dosis y de la duración del tratamiento y se ha propuesto que estos cambios son importantes en el desarrollo de la adicción (Herz, 1997). A pesar de todas estas evidencias, el efecto del alcohol sobre la β -endorfina y los receptores μ en las regiones pertenecientes al sistema de recompensa del cerebro ha sido muy poco estudiado. Los resultados publicados hasta el momento son inconsistentes y se han enfocado principalmente al nivel neuroendocrino o se han realizado en roedores seleccionados para preferir la droga. Nosotros consideramos importante ampliar los conocimientos existentes en este campo con el objetivo de aportar un mejor entendimiento del papel del sistema endorfinérgico en los mecanismos de reforzamiento del alcohol.

Nuestro laboratorio se ha concentrado en investigar las modificaciones inducidas por el alcohol sobre la transmisión opioidérgica en las regiones pertenecientes al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Uno de los aspectos que nos ha interesado investigar es el efecto del alcohol sobre los precursores de opioides (Méndez y Morales-Mulia, 2006; Méndez et al., 2008). Desafortunadamente la existencia del ARNm de POMC, precursor de la β -END no ha sido claramente demostrada en la vía mesocorticolímbica. Este ARNm parece estar restringido principalmente al hipotálamo y el núcleo del tracto solitario; sin embargo, estudios de inmunohistoquímica han

revelado la presencia de diversos productos del procesamiento del POMC en varias regiones del cerebro incluyendo el núcleo accumbens, el mesencéfalo y diversas áreas corticales sugiriendo que estas áreas podrían contener neuronas POMCérgicas. Por lo cual, el primer objetivo del presente trabajo fue averiguar si el precursor de la β -endorfina se encontraba en regiones pertenecientes a la vía de recompensa. Demostrar que el ARNm de POMC está presente en estas áreas es un punto fundamental en el discernimiento del origen de las redes neuronales POMCérgicas involucradas en las conductas motivadas tales como el consumo de alcohol y nos permitió iniciar el estudio del efecto de la droga sobre su expresión.

El segundo aspecto que nos ha interesado es investigar el efecto de la exposición aguda y crónica al alcohol sobre el sistema β -endorfinérgico. El consumo de etanol altera diferencialmente la transmisión β -endorfinérgica dependiendo del tiempo de exposición a la droga y estos cambios neuroadaptativos podrían estar relacionados con la adicción a la droga (Schulz et al., 1980; Lukhananov et al., 1985; Méndez y Morales-Mulia, 2008). Estudios previos del laboratorio demostraron que la administración de una dosis aguda de alcohol altera de manera transitoria la unión de $^3\text{[H]-DAMGO}$ al receptor μ en diversas regiones de la vía de recompensa (Méndez et al., 2001). Consecuentemente, el segundo objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento agudo y crónico con alcohol sobre el contenido de β -END en diversas regiones del sistema DAérgico así como, el efecto de la exposición prolongada al alcohol sobre los receptores μ en la vía de recompensa del cerebro.

Hipótesis

Las numerosas evidencias presentadas anteriormente sugieren que tanto la β -END como el receptor μ están involucrados en los mecanismos de reforzamiento del alcohol. De acuerdo con esto, proponemos que el tratamiento agudo y crónico con alcohol modificará diferencialmente los niveles de β -END en diversas regiones del sistema DAérgico y en el hipotálamo. Además, el tratamiento crónico con alcohol alterará la unión de DAMGO a los receptores μ .

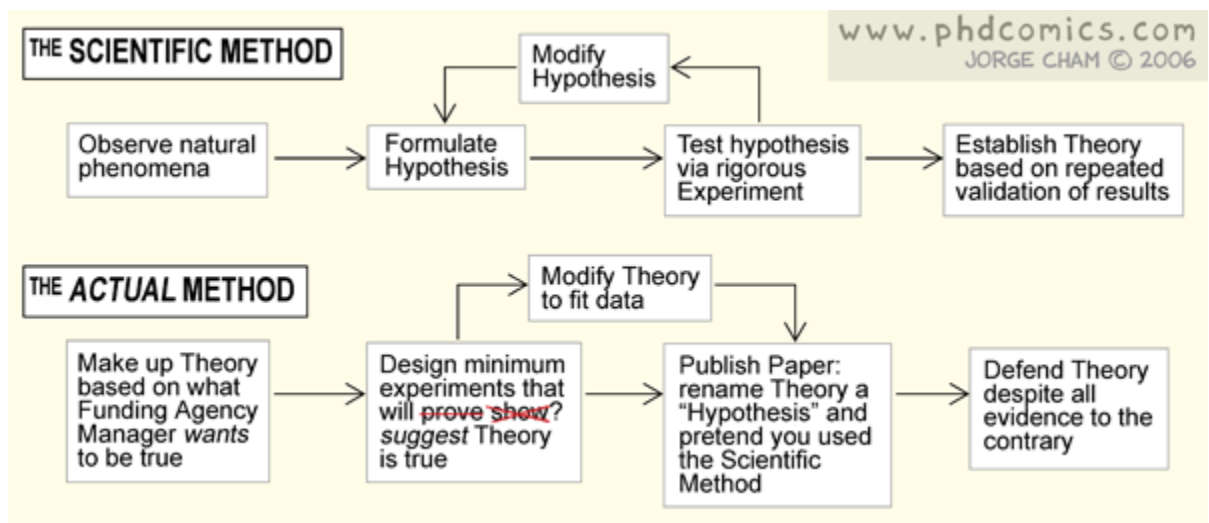
Objetivo general:

Investigar el papel de sistema β -endorfinérgico en los mecanismos de reforzamiento del alcohol en la vía mesocorticolímbica del cerebro de la rata.

Objetivos específicos:

1. Investigar si el ARNm de POMC, precursor de la β -END, se encuentra presente en la corteza, el núcleo accumbens y el área tegmental ventral.
2. Estudiar el efecto del tratamiento agudo y crónico con alcohol sobre el contenido de β -END en la corteza frontal, el núcleo accumbens, el área tegmental ventral, la sustancia nigra y el hipotálamo.
3. Investigar el efecto del tratamiento crónico con alcohol sobre la unión de $^3\text{[H]}$ -DAMGO a receptores a opioides μ en la corteza frontal, el núcleo accumbens y el área tegmental ventral.

Métodos



Presencia del ARNm de POMC en la vía mesocorticolímbica.

Hibridación in situ del ARNm de POMC

Con el objetivo de investigar si el ARNm de POMC está presente en la CPF, el NAcc y el ATV, así como para conocer la distribución de este ARN en el cerebro de la rata utilizamos la técnica de hibridación in situ. Brevemente, se utilizó un oligonucleótido de 24 bases d(GCG ACC CCG TTC GGC CAC CCG TTC) (3'-5') que es complementario a una región del ARNm de POMC que codifica para un fragmento de la corticotropina (residuos 8 a 15) (Nakanishi et al., 1979; Lewis et al., 1986). El oligonucleótido se marcó con α -[^{35}S]-ATP por medio de la enzima transferasa de deoxinucleótidos y se obtuvo una actividad específica promedio de 1.5×10^8 cpm/ μg de oligonucleótido (ver artículo II: Leriche et al., 2007). La hibridación in situ se llevó a cabo como se describe en Méndez y Morales-Mulia (2006), con algunas modificaciones. Las secciones se incubaron en la solución de hibridación conteniendo diferentes cantidades de oligonucleótido marcado (250, 000, 500, 000 o 750 000 cpm/corte) durante una noche a 40 °C y posteriormente enjuagadas en soluciones de citratos de diferentes concentraciones (ver Leriche et al., 2007). Para detectar la señal utilizamos películas sensibles a ^{35}S (Hyperfilm β_{max} de Amersham). La exposición de las películas se llevó a cabo durante 1 a 12 semanas y después se revelaron. Las condiciones óptimas para la detección del ARNm de POMC fueron 250,000 cpm por corte y exposición de 1 semana para el hipotálamo o 12 semanas para las demás regiones estudiadas. La hibridación inespecífica se determinó utilizando un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado. Los autoradiogramas se cuantificaron por densitometría, utilizando un programa de análisis de imágenes (Image-Pro Plus Software, Media Cybernetics).

Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la transcripción reversa del ARNm de POMC

Con el objeto de confirmar la presencia del ARNm de POMC en las regiones del cerebro involucradas en los mecanismos de recompensa llevamos a cabo la reacción de la polimerasa en cadena acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR). Brevemente, extrajimos el ARN total del hipotálamo, CPFm, NAcc y ATV (Figura 1 tomada de Leriche et al., 2007) utilizando tiocianato de guanidina, como se ha descrito previamente (Pérez-Martínez et al., 1998).

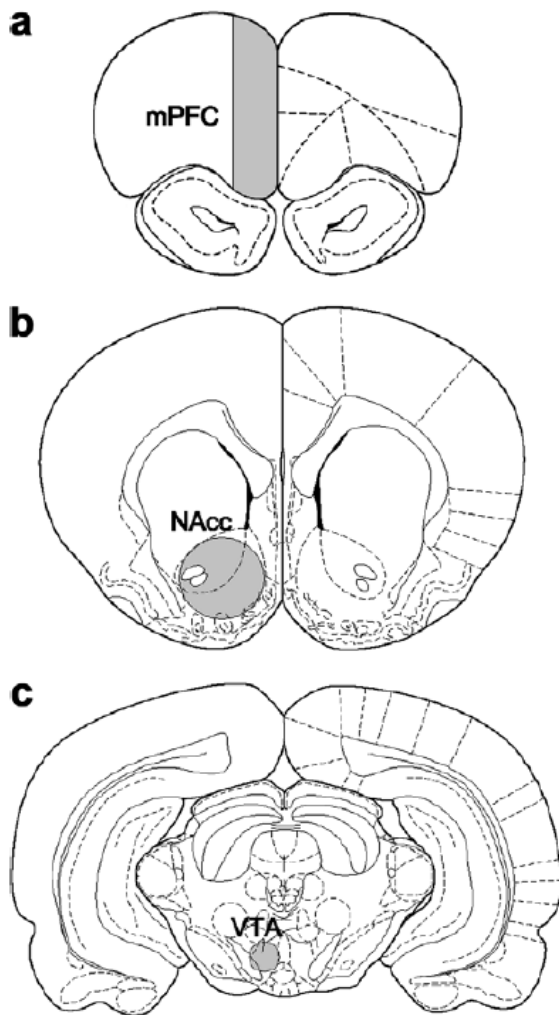


Figura 1. Representación esquemática de cortes coronales del cerebro de la rata mostrando la corteza prefrontal medial, el núcleo accumbens y el área tegmental ventral. Las áreas sombreadas corresponden a las regiones extraídas: la corteza prefrontal medial (mPFC), 4.20 mm respecto a bregma (a), el núcleo accumbens (NAcc), 1.70 mm respecto a bregma (b) y el área tegmental ventral (VTA), -6.04 respecto a bregma (c). Modificado del Atlas de Paxinos y Watson (1998).

Posteriormente, se llevó a cabo la transcripción reversa del ARN. Utilizamos 2 pares de sondas que llamamos para fines prácticos POMC 1 y POMC 2. Las sondas POMC 1 (sentido 5'-GAA GCG GCG CCC TGT GAA-3' y antisentido 5'-CTC GCC TTC CAG CTC CCT CTT-3') amplifican un segmento del exón 3 (originando un producto de 94 pb) (Lindblom et al., 2005) y las POMC 2 (sentido 5'-GAGATTCTG CTA CAG TCG CTC-3' y antisentido 5'-TTG ATG ATG GCG TTC TTG AA-3') amplifican un segmento del exón 2 y el exón 3 (producto de 678 pb) (Grauerholz et al., 1998). El primer par de sondas fue utilizado para medir las diferencias de concentración en las diversas regiones estudiadas; el segundo par de sondas fue utilizado para confirmar la presencia del ARNm de POMC completo (es decir que contiene la secuencia que origina al péptido señal el cual se encuentra en el exón 2). Esto es importante porque existe una forma truncada del ARNm de POMC, constituida solamente por el exón 3) (Chen et al., 1984). Las condiciones óptimas de temperatura y número de ciclos fueron determinadas (Figuras 2 y 3, tomadas del artículo II: Leriche et al., 2007).

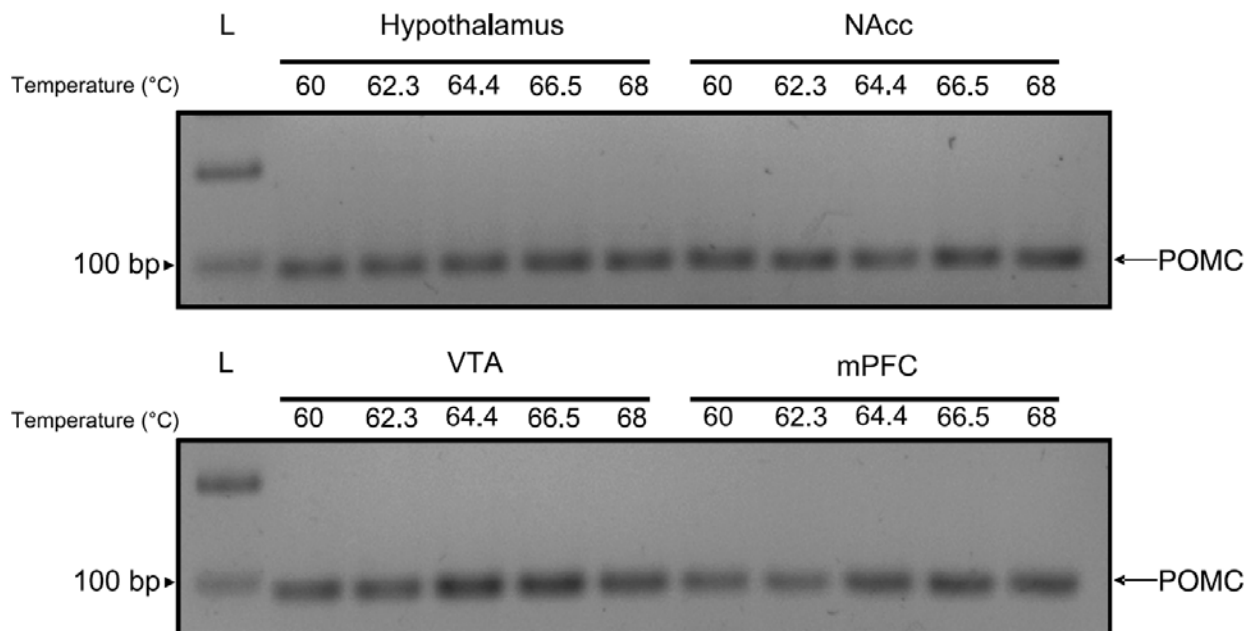


Figura 2. Efecto de la temperatura de alineamiento sobre la amplificación del ARNm de POMC por PCR. Se extrajo el ARN total de las diferentes regiones del cerebro y los cDNA se obtuvieron mediante la reacción de RT y se llevó a cabo la PCR. Las fotografías de los geles muestran el producto de 94 pb obtenido del hipotálamo (H), núcleo accumbens (NAcc), el área tegmental ventral (VTA) y la corteza prefrontal medial (mPFC) utilizando diferentes temperaturas de alineamiento. L= Escala de tamaño molecular.

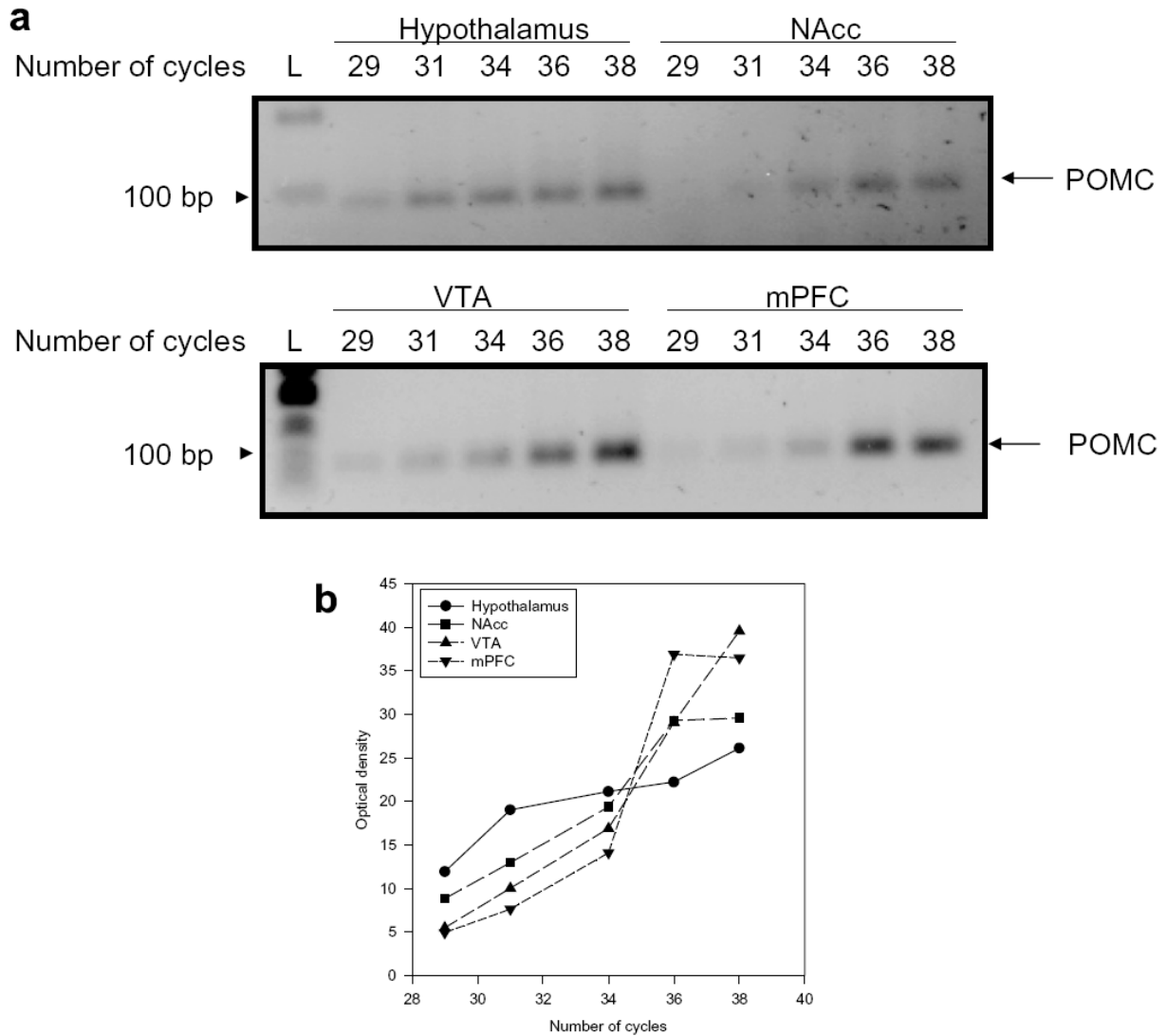


Figura 3. Amplificación del ARNm de POMC por PCR utilizando diferente numero de ciclos. Se extrajo el ARN total de las diferentes regiones del cerebro y los cDNA se obtuvieron mediante la reacción de RT y se llevó a cabo la PCR. Las fotografías de los geles muestran el producto de 94 pb obtenido del hipotálamo (H), núcleo accumbens (NAcc), el área tegmental ventral (VTA) y la corteza prefrontal medial (mPFC) mediante el incremento del número de ciclos (a). La intensidad de la banda POMC fue cuantificada por densitometría y graficada contra el número de ciclos (b). L= Escala de tamaño molecular.

Realizamos dos controles negativos: 1) Omitiendo la enzima de transcripción reversa y 2) utilizando el ARN total de células gliales C-6, las cuales no sintetizan POMC (Figura 4 a y b respectivamente, tomadas del artículo II: Leriche et al., 2007).

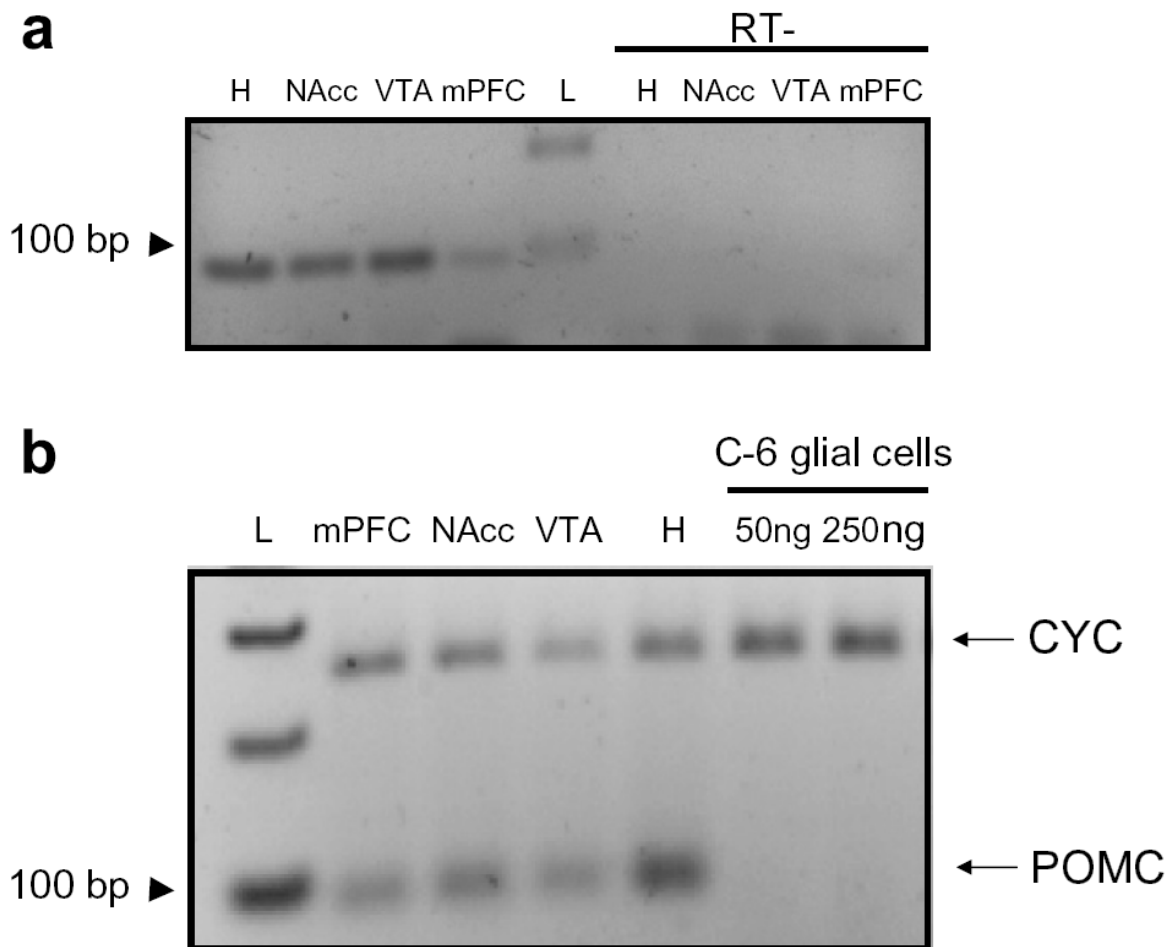


Figura 4. Controles negativos de la RT-PCR utilizando ARN total obtenido de las regiones de interés del cerebro de rata y de la línea de células gliales C-6. El ARN total obtenido de las diferentes regiones del cerebro de rata fue adicionado a la mezcla de reacción de RT en presencia o ausencia (RT-) de la enzima de RT y posteriormente se llevo a cabo la PCR (a). Adicionalmente, se obtuvo cDNA por RT a partir del ARN total de diversas regiones del cerebro y de la línea de células gliales C-6 y se llevó a cabo la PCR utilizando las sondas POMC 1 y de ciclofilina (CYC) (b). Se muestran experimentos utilizando 50 y 250 ng de cDNA obtenido a partir de ARN total de la línea de células gliales C-6. La fotografía de los geles muestra el producto de 94 pb de la PCR. H= hipotálamo, NAcc= núcleo accumbens, VTA= área tegmental ventral (VTA), mPFC= corteza prefrontal medial, L= Escala de tamaño molecular.

Para determinar la concentración relativa del ARNm de POMC en las regiones de interés utilizamos un protocolo semicuantitativo: amplificamos simultáneamente POMC y un gen constitutivo, la ciclofilina (CYC) y ajustamos el total del producto de amplificación del POMC relativo al de la ciclofilina. Por último calculamos el porcentaje de cDNA de POMC encontrado en la CPFm, el NAcc y la VTA en relación al hipotálamo (considerando este último como el 100%).

Efecto del tratamiento agudo y crónico con alcohol sobre el contenido de la β -endorfina y la exposición prolongada a la droga sobre la unión de [3 H]-DAMGO al receptor opioide μ .

Tratamiento de los animales

El tratamiento agudo y crónico con alcohol se llevó a cabo como se describe detalladamente en el artículo II (Leriche y Méndez, 2010). Brevemente, para el tratamiento agudo con alcohol se utilizaron ratas (Wistar) macho adultas (200-300 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. En el octavo día recibieron una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg) (grupo experimental) o agua destilada (grupo control) por vía intragástrica. Los animales se sacrificaron 30 min, 1, 2, 4, 8 o 24 h después de la administración de etanol o agua. Para la determinación de la concentración de β -endorfina se extrajeron los cerebros y se congelaron en hielo seco y preservados a -70° C para posteriormente diseccionar las regiones de interés (ver Leriche y Méndez, 2010).

El tratamiento crónico con alcohol se llevó a cabo como se describe en el artículo II (ver Leriche y Méndez, 2010). Brevemente, ratas Wistar macho de aproximadamente 200 g al inicio del tratamiento fueron divididas en 4 grupos: etanol (E), sacarosa (S), agua (A) y *ad libitum* o control (C). Los grupos E y C tuvieron acceso *ad libitum* al alimento sólido y a una solución de etanol al 10 % (v/v) o agua, respectivamente. Los grupos de sacarosa y agua fueron alimentados con la misma cantidad de comida y líquido que consumieron las ratas del grupo de etanol (con una solución isocalórica de sacarosa o agua, respectivamente). La solución de sacarosa (14.14 %) se utilizó para reemplazar las calorías que aporta el etanol. Este tratamiento duró 4 semanas, al término de las cuales los animales fueron sacrificados. Para la determinación de la concentración de β -endorfina se extrajeron los cerebros inmediatamente y se congelaron con hielo seco y fueron preservados a -70° C. Posteriormente, se obtuvieron las regiones de interés. Para los experimentos de unión

de [³H]-DAMGO se obtuvieron cortes coronales de 20 μm de grosor en un criostato, los cuales se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se guardaron a -70 °C.

Radioinmunoensayo de β-endorfina

Con el objetivo de estudiar el efecto de los tratamientos agudo y crónico con alcohol sobre el contenido de la β-endorfina se utilizó la técnica de radioinmunoensayo (RIA). El péptido fue extraído del tejido según Rasmussen y colaboradores (1998). Para llevar a cabo el RIA se elaboró el trazador utilizando la técnica de la cloramina T, como se ha descrito anteriormente (Rees et al., 1971; Deby-Dupont et al., 1983). El trazador se separó del yodo libre utilizando una columna de Sephadex G-50. Para medir la concentración de β-endorfina, el RIA se realizó como se indica en la hoja técnica del anticuerpo contra β-endorfina (Bachem) con algunas modificaciones (ver artículo I Leriche y Méndez, 2010). También se determinó el contenido de proteína total por región utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Autoradiografía de receptores

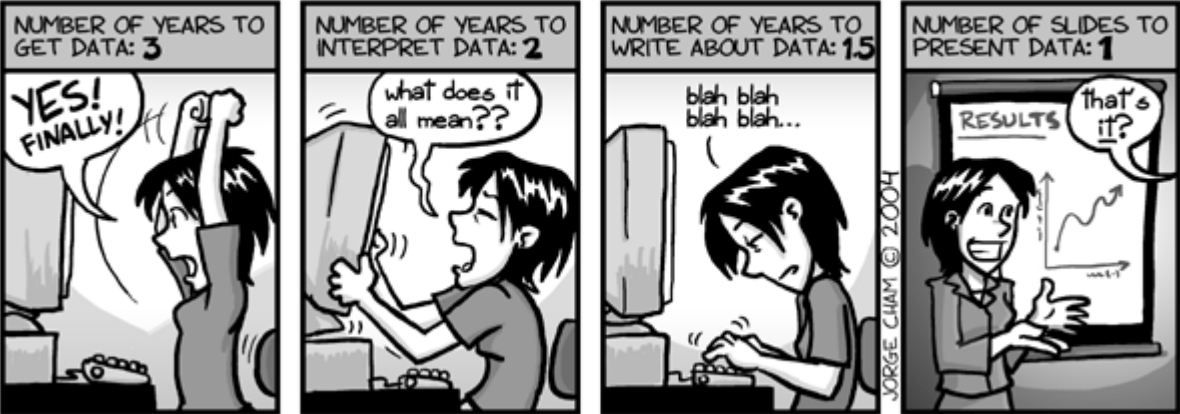
Los efectos del tratamiento crónico con etanol sobre la unión de [³H]-DAMGO a los receptores μ se evaluaron por autoradiografía cuantitativa de receptores, como se ha descrito previamente (Méndez et al., 2001). Concisamente, los cortes se incubaron en una solución Tris-HCl 50 mM conteniendo 8 nM de [³H]-DAMGO (unión total). La unión inespecífica se determinó en una serie paralela de secciones incubadas en presencia de 10 μM de naloxona. Las secciones se colocaron en casetes de autoradiografía (Amersham) en presencia de estándares de ³H (marca ARC) y en aposición con un film sensible a tritio (Kodak BioMax MS). Se dejó exponer 24 semanas. Los autoradiogramas se cuantificaron por densitometría utilizando una cámara conectada a un sistema de análisis de imágenes computarizado (programa IMAGE 1.61, NIH). Se tomaron 4 a 16 mediciones de la densidad en 20 diferentes secciones provenientes de cada animal (ver artículo I: Leriche y Méndez, 2010).

Análisis estadísticos

Para investigar el curso temporal del efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -END utilizamos el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías siendo el tratamiento y el tiempo transcurrido después de la administración los factores independientes. Para investigar las diferencias en el contenido del péptido entre los grupos control y tratados con etanol 1 h después de la administración, aplicamos la prueba t de Student para muestras independientes. Para los tratamientos crónicos con alcohol sobre el contenido de β -END y unión de [3 H]-DAMGO empleamos la ANOVA de una vía para analizar el efecto de los tratamientos; el test de Tukey-HSD fue utilizado para investigar si había diferencias significativas entre grupos.

Resultados

DATA: BY THE NUMBERS



www.phdcomics.com

A continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis. Este resumen está dividido en 2 secciones y cada una va seguida por el artículo correspondiente.

Presencia del ARNm de POMC en diversas regiones de la vía de recompensa del cerebro de la rata.

El objetivo de este trabajo fue investigar si el ARNm que da origen a la POMC se encuentra en áreas del sistema mesocorticolímbico. Utilizando la técnica de hibridación in situ demostramos que este ARN se encuentra en la CPF, NAcc, H y ATV (Figura 9 a, c, e y g). Esta técnica también nos permitió examinar la distribución del ARNm de POMC; en el H la señal se concentró principalmente en los núcleos arcuatos como se ha reportado previamente. Los niveles detectados en las regiones de interés (CPF, NAcc y ATV) son bajos y están homogéneamente distribuidos excepto por la capa I de la corteza donde la densidad es aún menor. También detectamos al ARNm de POMC en otras regiones (e.g. el núcleo olfatorio anterior, la SN, las cortezas cingular, motora, piriforme, auditoria, visual secundaria, entorrinal, etc) (Figura 9).

Los resultados obtenidos por RT-PCR confirman que el ARNm de POMC se encuentra presente en la CPFm, el NAcc y el ATV. Comprobamos que la señal observada no se debe a contaminación con ADN en la muestra (Figura 4a) y que no todos los tejidos la producen (Figura 4b). La concentración del ARNm de POMC se determinó semicuantitativamente y se consideró al hipotálamo como el 100%. Así, con respecto al hipotálamo los niveles encontrados en la CPFm corresponden al $21.63 \pm 2.7\%$ ($n = 3$), $27.02 \pm 0.7\%$ ($n = 3$) al NAcc y $31.4 \pm 7.7\%$ ($n = 3$) al ATV (Figura 10). También demostramos que la señal observada corresponde al ARNm de POMC que puede ser traducido ya que la secuencia amplificada incluye al exón 2 donde se encuentra el péptido señal (Figura 11).

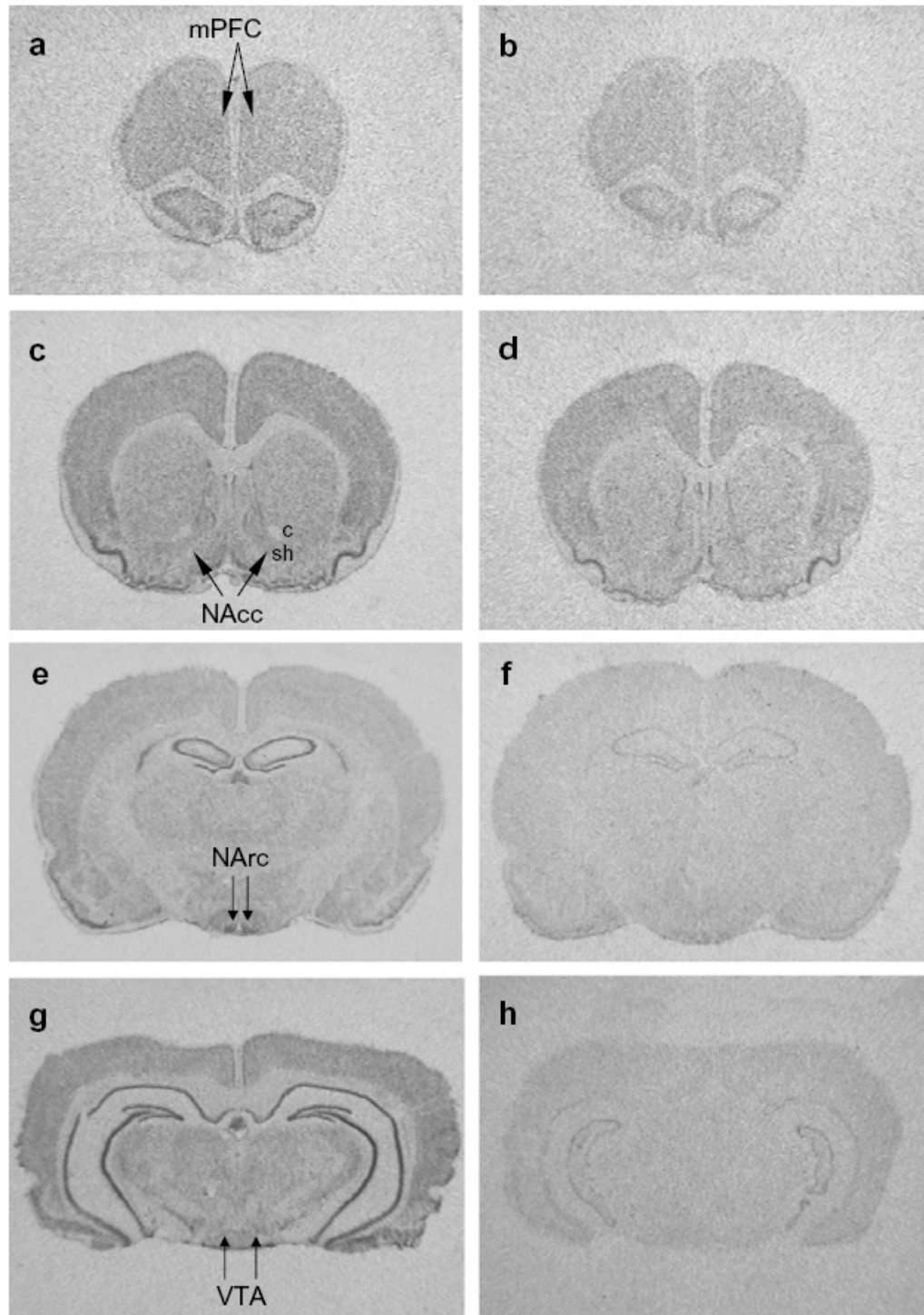


Figura 9. Expresión del ARNm de POMC detectada por hibridación in situ. En la sección de métodos se describe como se llevó a cabo la hibridación in situ de POMC. Las fotografías de los films muestran en la primera columna la hibridación total y en la segunda la hibridación inespecífica de la corteza prefrontal (a, b), el núcleo accumbens (c, d), los núcleos arcuatos del hipotálamo (e, f) y el área tegmental ventral (g, h). El tiempo de exposición de los films fue de una semana para el hipotálamo y 12 para las demás regiones. mPFC= corteza prefrontal medial, NAcc= núcleo accumbens, c= centro del NAcc, sh= cubierta del NAcc, NArc= núcleos arcuatos del hipotálamo, VTA= área tegmental ventral.

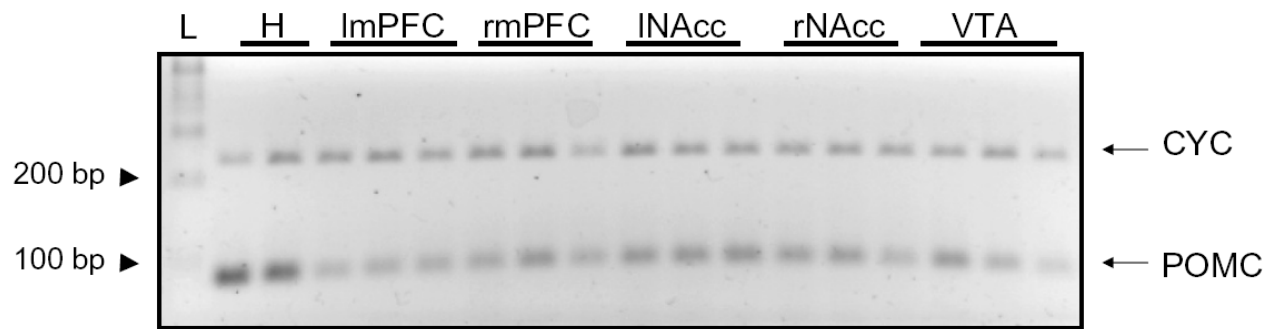


Figura 10. Detección del ARNm de POMC mediante RT-PCR en áreas del cerebro de la rata. El ARN total fue extraído de diferentes regiones del cerebro de rata, se obtuvo el cDNA por RT y se llevó a cabo la PCR. Las fotografías de los geles muestran los productos de la PCR obtenidos de la amplificación simultánea de POMC (94 pb) y el gen constitutivo ciclofilina (CYC). L= Escala de tamaño molecular, H= hipotálamo, ImPFC= corteza prefrontal medial izquierda, rmPFC= corteza prefrontal medial derecha, INAcc= núcleo accumbens izquierdo, rNAcc= núcleo accumbens derecho, VTA= área tegmental ventral.

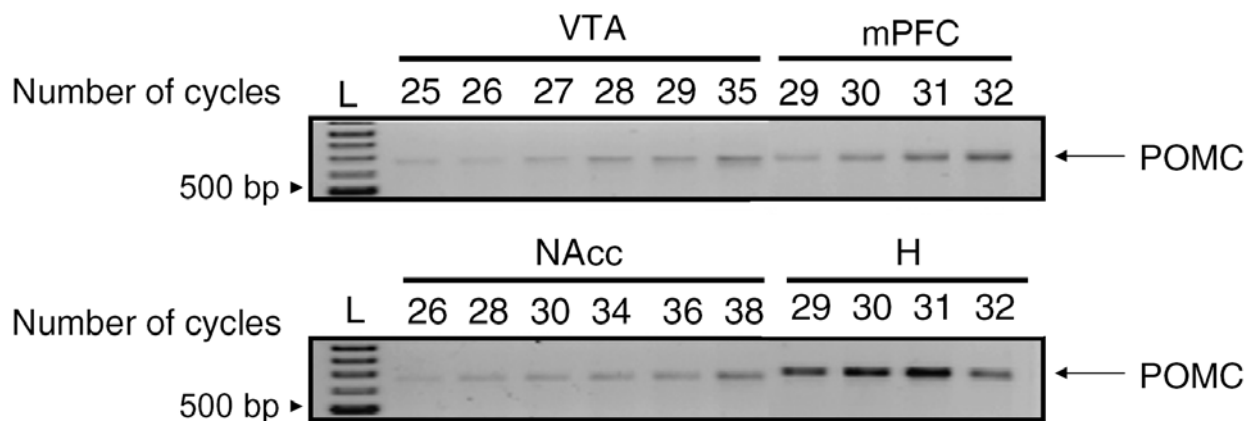


Figura 11. Amplificación de la forma completa de POMC por PCR. El ARN total fue extraído de diferentes regiones del cerebro de rata, se obtuvo el cDNA por RT y se llevó a cabo la PCR. Las fotografías de los geles muestran los productos de amplificación de 678 pb del área tegmental ventral (VTA), la corteza prefrontal medial (mPFC), el núcleo accumbens (NAcc) y el hipotálamo (H) obtenidos al diferente número de ciclos. L= Escala de tamaño molecular.



Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: Studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques

Mariana Leriche^a, Antonieta Cote-Vélez^b, Milagros Méndez^{a,*}

^a Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México DF, Mexico

^b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Received 7 March 2007; accepted 30 August 2007

Available online 5 November 2007

Abstract

Pro-opiomelanocortin (POMC) is a large proteic precursor which originates several biologically active neuropeptides, such as β -lipotropin (β -LPH), β -endorphin (β -END), adenocorticotrophic hormone (ACTH) and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). The arcuate nucleus of the hypothalamus is the main POMC producing cell group in brain and innervates several areas of the limbic system and brainstem. POMC-derived neuropeptides have been related to several motivated and rewarding behaviours, including sexual facilitation, feeding, and drug addiction. However, POMC mRNA has not been detected in regions of the dopaminergic mesocorticolimbic system, which represents the most important reward pathway. The aim of this work was to investigate if POMC mRNA is expressed in the medial prefrontal cortex (mPFC), the nucleus accumbens (NAcc) and the ventral tegmental area (VTA) of the rat. We used the reverse transcriptase reaction coupled to the polymerase chain reaction (RT-PCR). We also used the in situ hybridization technique to study the regional distribution of POMC mRNA in the same regions. We report that RT-PCR amplification of extracted RNA with two different pairs of primers generates the predicted 94 bp and 678 bp POMC-PCR products. Both the amplification of RNA obtained from the rat glial C-6 cell line (which does not express POMC mRNA) and the omission of reverse transcriptase from the RT reaction of rat brain samples showed no amplification products. We have shown for the first time that the rat medial prefrontal cortex, the nucleus accumbens and the ventral tegmental area contain POMC mRNA. This mRNA is in low concentration, ranging from 21% to 31% with respect to the hypothalamus. In situ hybridization experiments showed that POMC mRNA is homogeneously distributed in these areas. The presence of POMC mRNA in regions of the mesocorticolimbic system could have functional implications in motivated behaviours.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pro-opiomelanocortin mRNA; POMC peptides; Dopaminergic mesocorticolimbic system; Prefrontal cortex; Nucleus accumbens; Ventral tegmental area; RT-PCR; In situ hybridization

1. Introduction

Pro-opiomelanocortin (POMC) is a large proteic precursor that gives rise to several biologically active neuropeptides, including β -lipotropin (β -LPH), β -endorphin

(β -END), adenocorticotrophic hormone (ACTH) and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) (Akil et al., 1984). The activity of some of these peptides is related to motivated behaviours and to other important functions (Tregear and Coghlan, 1980; Kiefer and Wiedemann, 2004).

Neurons containing POMC-derived peptides are widely distributed in the rat brain (Mansour et al., 1988). However, the presence of POMC mRNA is mainly

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 55 28 11x212; fax: +52 55 55 13 37 22.

E-mail address: ubach@imp.edu.mx (M. Méndez).

restricted to the arcuate nucleus (NArc) and adjacent regions of the medial basal hypothalamus, and to the nucleus of the solitary tract (NST) (Schwartzberg and Nakane, 1983; Cuello et al., 1983; Akil et al., 1984). NArc fibers project to several areas of the forebrain (particularly limbic and hypothalamic structures), the midbrain, some brainstem nuclei, and the spinal cord (Cuello et al., 1983; Akil et al., 1984). Hypothalamic POMC neurons have been associated with several physiological functions and behaviours, such as regulation of eating, respiration and limbic excitability, pain perception and analgesia, drug addiction, sexual behaviour, locomotion, learning and memory, cardiovascular homeostasis and hypophyseal hormone secretion (Tregear and Coghlan, 1980; Kiefer and Wiedemann, 2004). In the NST, the POMC mRNA-containing neurons are fewer than those in the NArc and have a scattered distribution. These neurons innervate several brainstem nuclei that regulate cardiovascular and respiratory homeostasis (Palkovits et al., 1987; Joseph and Michael, 1988).

POMC-derived peptides are distributed in brain regions of the dopaminergic (DAergic) mesolimbic system, which has long been known to be largely involved in motivated and reward behaviours (Wise and Rompre, 1989; Kalivas and Volkow, 2005). This pathway is originated in the ventral tegmental area (VTA), which projects to the nucleus accumbens (NAcc) and the prefrontal cortex (PFC). Activation of DAergic transmission in this pathway, which leads to stimulation of dopamine (DA) release from the NAcc, is a key event in the rewarding and reinforcing actions elicited by several psychotropic substances, including psychostimulants, opiates, nicotine, and alcohol (Di Chiara and Imperato, 1988; Koob and Bloom, 1988; Di Chiara et al., 1996). Several studies have shown that opioid peptides (β -END, enkephalins, and dynorphins) regulate the DAergic mesolimbic activity through interaction with μ (μ), δ (δ) and κ (κ) opioid receptors, respectively (Spanagel et al., 1990, 1991, 1992). Activation of μ and δ receptors is rewarding and may modulate the release of DA from the NAcc (Shippenberg et al., 1987; Spanagel et al., 1990). Several studies suggest that β -END could play an important role in several rewarding behaviours, including the reinforcing effects of several drugs of abuse (Amalric et al., 1987; Herz, 1997; Olive et al., 2001; Solinas et al., 2004; Roth-Deri et al., 2006).

Besides the NArc and the NST, POMC mRNA has also been detected in other brain regions such as the amygdala, the cerebral cortex, the cerebellum, the hippocampus, and the striatum, although in lower levels than in the NArc and NST (Civelli et al., 1982; Grauerholz et al., 1998). Since opioid peptides may exert important functional roles in drug reward and reinforcement, it is important to determine whether β -END is synthesized in regions of the mesocorticolimbic system. The demonstration of POMC mRNA occurrence in these

areas is a central issue concerning the origin of neural networks containing POMC-derived peptides involved in motivated behaviours, as well as in other important functions. Thus, the aim of this work was to investigate if POMC mRNA is present in specific brain regions of the rat dopaminergic mesocorticolimbic system, i.e., the VTA, the NAcc, and the medial PFC (mPFC). To answer this question, we used the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), since POMC mRNA has not been detected with other techniques in these regions (Civelli et al., 1982). We have also used the *in situ* hybridization technique, in order to study the regional distribution of POMC mRNA in brain tissue. We have found that POMC mRNA is *in fact* expressed in low concentrations in the VTA, the NAcc, and the mPFC, in comparison with the hypothalamus (H). Our results suggest that drug reward and motivated behaviours could be regulated by POMC-derived peptides synthesized in these brain areas.

2. Materials and methods

2.1. Animals and brain dissections

Adult male Wistar rats (250–300 g) were killed by decapitation and brains were carefully removed and frozen. Brain dissections were made according to Palkovits and Brownstein (1988). We used an acrylic matrix and micron tissue punches to obtain the samples of rat brain areas. The mPFC was obtained from a slice of approximately 1.2 mm wide, from 5.4 to 4.2 mm with reference to Bregma (Fig. 1a). The NAcc was obtained from a slice of 2 mm wide, from approximately 3.0 to 0.9 mm from Bregma, using a micron tissue punch of 2 mm diameter (Fig. 1b). The VTA was obtained from a slice of 1 mm wide, from approximately –5.4 to –6.3 mm from Bregma, using a micron tissue punch of 1 mm diameter (Fig. 1c). The hypothalamus was also obtained. The different brain areas were frozen at –70 °C until the total RNA extraction procedure was performed. For *in situ* hybridization experiments coronal brain sections (20 μ m) of the rat brain were obtained in a cryostat, mounted on gelatin-coated slides and maintained at –70 °C.

All experimental procedures were performed in accordance with the National Institute of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80–23, revised 1996), as well as with the project's commission approval of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

2.2. RNA extraction

Total RNA from H, mPFC, NAcc, VTA and the C-6 glial cell line was extracted using 4 M guanidinium thio-

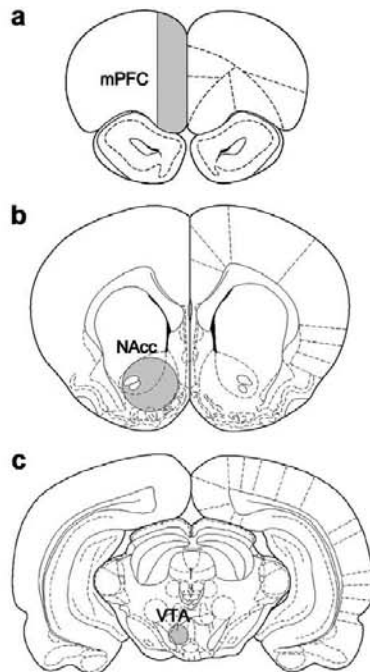


Fig. 1. Schematic representations of coronal sections of the rat brain showing the medial prefrontal cortex, the nucleus accumbens and the ventral tegmental area. Shaded areas represent the extracted regions: medial prefrontal cortex (mPFC), 4.20 mm from Bregma (a); nucleus accumbens (NAcc), 1.70 mm from Bregma (b) and ventral tegmental area (VTA), -6.04 mm from Bregma (c). Adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998).

cyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl and 0.1 M β -mercaptoethanol, as described previously (Pérez-Martínez et al., 1998). Concentrations and purity of RNA samples were determined by UV spectroscopy at 260/280 nm and integrity confirmed by electrophoresis through 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

2.3. Pro-opiomelanocortin-RT-PCR

Specific primer pairs used in the PCR were as follows: (1) POMC 1 sense (5'-GAA GCG GCG CCC TGT GAA-3') and POMC 1 antisense (5'-CTC GCC TTC CAG CTC CCT CTT-3') to amplify a segment of exon 3 (product size 94 bp) of the rat POMC mRNA (Lindblom et al., 2005); (2) POMC 2 sense (5'-GAG ATT CTG CTA CAG TCG CTC-3') and POMC 2 antisense (5'-TTG ATG ATG GCG TTC TTG AA-3') to amplify a region corresponding to a segment of exon 2 and exon 3 (product size 678 bp) (Grauerholz et al., 1998); (3) cyclophilin (CYC) sense (5'-GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA-3') and CYC antisense (5'-ACA TGC

TTG CCA TCC AGC C-3') (product size 256 bp) (Danielson et al., 1988). Cyclophilin was used as internal control to account for variations in PCR products due to possible differences in the efficiency of the RT and/or PCR reactions. We used the POMC 1 primers in order to measure the relative differences in POMC mRNA concentrations between rat brain regions. POMC 2 primers were used in order to confirm the presence of full-length POMC mRNA in these brain regions. Primers were synthesized at the Instituto de Biotecnología (UNAM).

Total RNA (1.5 μ g) was used as template for reverse transcription using a 15-mer oligonucleotide dT as primer (500 ng) (Boehringer). The synthesis reaction contained 1 \times reverse transcription buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 3.75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM dithiothreitol (DTT), 200 μ M deoxynucleotide triphosphates and 100 U reverse transcriptase (Gibco-BRL). Total RNA was preincubated for 5 min at 65 °C prior to cDNA synthesis. The reverse transcription reaction was carried out for 2 h at 37 °C.

PCR was performed in a final volume of 50 μ l containing 5 μ l of 5 \times PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 μ g/ml gelatin, 1% Triton, 1.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA)), 2.5 μ l MgCl₂ (1.5 mM), 1 μ l dNTP mix (10 mM), 1 μ l of each POMC oligonucleotide (25 pmol), 0.5 μ l of Taq-DNA-polymerase (5 U/ μ l, Tecnologías Universitarias, UNAM), 50 ng of DNA template for the hypothalamus and 250 ng for the other brain regions. PCR consisted of 1 min 15 s for denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 65 °C, 1 min for extension at 72 °C and a final extension cycle at 72 °C was included. To amplify the 678 bp POMC fragment, minor modifications were made to the procedure. In the PCR we used 50 pmol of each POMC primer and 375 ng of DNA template from the mPFC, the NAcc and the VTA and the annealing temperature was 64 °C. The POMC RT-PCR optimal conditions were chosen (see optimization of POMC-PCR technique section). PCR products were separated in 3% agarose gels stained with ethidium bromide (0.05 μ g/ml) and their molecular sizes were compared with a molecular size marker (100 bp ladder marker, Roche Applied Science). Intensities in each band resulting from PCR amplification were analyzed using an image analysis software (Multi analyst Bio-Rad) to calculate the relative amounts of POMC vs. cyclophilin cDNA. POMC cDNA percentage in the mPFC, NAcc and VTA was calculated relative to POMC cDNA in the hypothalamus.

2.4. Optimization of POMC-PCR technique

In order to measure the relative differences in POMC mRNA concentrations in rat brain regions we optimized the POMC-PCR technique. The considered

parameters were annealing temperature and the cycle number. In order to optimize primer annealing, we performed the PCR in a temperature gradient (60, 62.3, 64.4, 66.5, and 68 °C) using 30 cycles for the hypothalamus and 36 for the other brain regions (Fig. 2). PCR products in gels were analyzed by laser densitometry. Optimal annealing temperatures were found between 64.4 and 66.5 °C (Fig. 2). Thus, we selected 65 °C as the annealing temperature for further experiments. In addition, assays using different number of cycles showed that PCR products were easily detected in all brain regions between 29 and 38 cycles (Fig. 3a). As shown in Fig. 3b, using 34 cycles the technique is able to detect changes in the relative densities of the samples, since 34 cycles is at the mid-point of the linear phase of the curve (product vs. number of cycles). Thus, the optimal amplification conditions determined in this study were 65 °C as the annealing temperature and 34 cycles to obtain the 94 bp product (Figs. 2 and 3). Similar procedures were followed to obtain the 678 bp POMC amplification product. The optimal annealing temperature was 64 °C and the number of cycles varied depending on the region studied: 31 cycles for the hypothalamus and the mPFC, 34 for the VTA and 37 for the NAcc.

Since POMC mRNA is present in the hypothalamus (Civelli et al., 1982) we used this brain region as positive control. Two negative controls were included. First, the RT enzyme was omitted in the experiment and the POMC-PCR was carried out at 65 °C and 36 cycles for the H, the NAcc, the VTA, and the mPFC. A parallel series of PCR was carried out in normal conditions in the same regions. Second, another negative control was performed using total RNA extracted from the rat glial C-6 cell line, in which POMC mRNA expression has not

been reported. The PCR was carried out in the above-mentioned conditions.

After optimization of the POMC-PCR technique, we developed a semi quantitative PCR protocol (Zaheer et al., 1995) to simultaneously amplify POMC and cyclophilin cDNAs. The housekeeping gene cyclophilin was used as internal control to account for variations in PCR products due to possible differences in the efficiency of the RT or PCR reactions. We determined the relative concentrations of POMC mRNA in both the left and right sides of the mPFC and the NAcc, as well as in the whole VTA and H. Aliquots of PCR products were electrophoresed in 3% agarose gels and stained with ethidium bromide. Gels were analyzed by laser densitometry to calculate the relative amounts of POMC amplification products vs. those of cyclophilin. POMC cDNA percentage in the mPFC, the NAcc and the VTA was calculated relative to that in the H.

2.5. *In situ* hybridization

POMC mRNA expression was studied using a 24-mer oligonucleotide complementary to the bovine POMC mRNA region coding for a corticotropin fragment (residues 8–15) (Nakanishi et al., 1979; Lewis et al., 1986), which is 100% homologous to the rat sequence (Drouin et al., 1985). The oligonucleotide 5'-CTT GCC CAC CGG CTT GCC CCA GCG-3' (GENOSYS) was labeled at the 3' end using α - ^{35}S -ATP (1000 Ci/mmol, Amersham) and deoxynucleotidyl transferase (25 U/ μl , Roche Applied Science) to a specific activity of 1.5×10^8 cpm/ μg of oligonucleotide. *In situ* hybridization was performed as previously reported (Méndez and Morales-Mulia, 2006), with minor modifications. Briefly, brain sections mounted in gelatin-

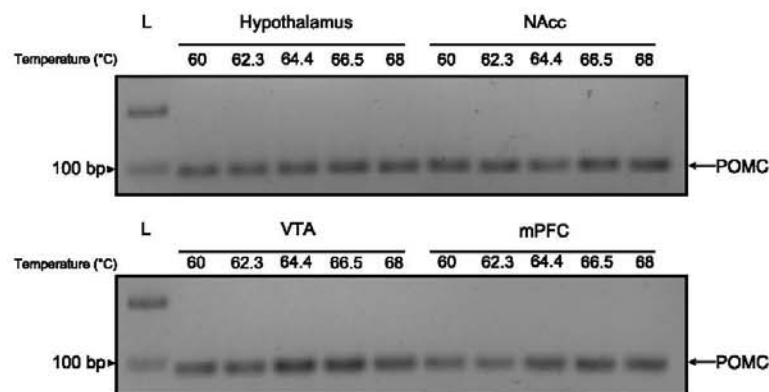


Fig. 2. Effect of annealing temperature on POMC PCR amplification. Total RNA was extracted from different brain regions, cDNAs obtained by RT reaction and PCR performed as described in Section 2. Gel photographs show a PCR product of 94 bp obtained from the hypothalamus, the nucleus accumbens (NAcc), the ventral tegmental area (VTA) and the medial prefrontal cortex (mPFC) using different annealing temperatures. L = Molecular size marker.

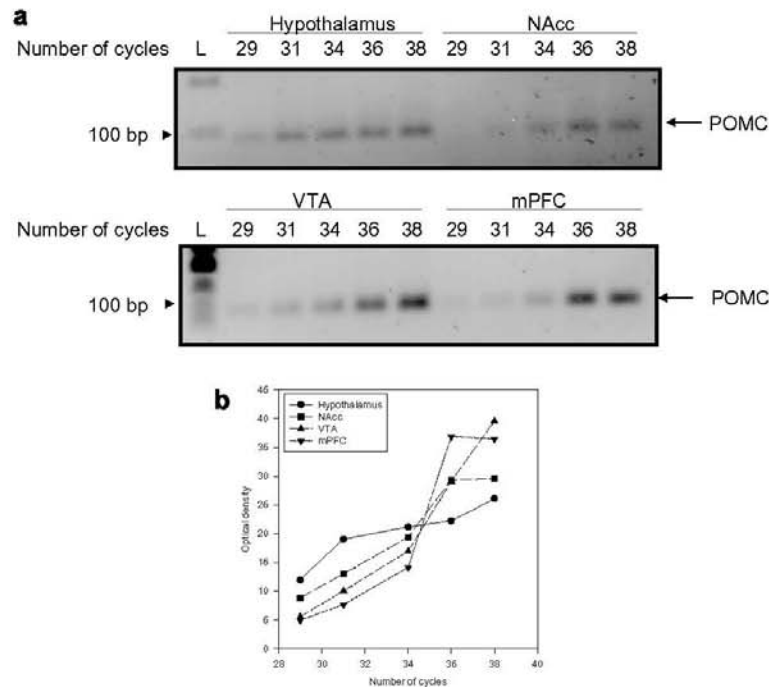


Fig. 3. POMC PCR amplification at different number of cycles. Total RNA was extracted from different brain regions, cDNAs obtained by RT reaction and PCR performed as described in Section 2. Gel photographs show a 94 bp PCR product obtained from the hypothalamus (H), the nucleus accumbens (NAcc), the ventral tegmental area (VTA) and the medial prefrontal cortex (mPFC) by increasing the number of cycles (a). The intensity in the POMC band was quantified by densitometry and was plotted vs. the number of cycles (b). L = Molecular size marker.

coated slides were fixed, dehydrated and delipidated. Sections were preincubated for 1 h at 40 °C and then incubated overnight in hybridization buffer containing 4× standard saline citrate (SSC), 50% deionized formamide, 2.5× Denhardt's solution (0.5% Ficoll, 0.5% polyvinylpyrrolidone, 0.5% bovine albumin), 100 µg/ml sheared single-stranded salmon sperm DNA (Sigma), 10% dextran sulphate, 10 mM dithiothreitol, 100 mM Na phosphate buffer (pH 7.4), 250 µg/ml yeast tRNA (Sigma) and ³⁵S-labeled oligonucleotide probe to get 250 000, 500 000, or 750 000 cpm/section. After incubation, sections were washed in 4× SSC containing 0.02% sodium dodecyl sulphate (SDS) at 40 °C during 30 min in constant stirring, followed by 30 min in 2× SSC – 0.02% SDS and 30 min in 1× SSC – 0.02% SDS, and finally 10 min in 0.5× SSC at room temperature. Sections were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and 95% ethanol containing 0.3 M ammonium acetate and air dried. The slices were placed in apposition with β_{max} Hyperfilm (Amersham) and exposed for 1, 2, 3, 6 or 12 weeks at room temperature in the dark. The optimal conditions to detect POMC mRNA were attained with 250 000 cpm/section and different exposi-

tion times, depending on the brain region: 1 week for the hypothalamus and 12 weeks for the PFC, the NAcc and the VTA. Non-specific POMC hybridization was tested with an excess of 100 times the oligonucleotide concentration and the signal was subtracted from total hybridization. Autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (Image-Pro Plus Software, Media Cybernetics). Brain structures were identified according to Paxinos and Watson (1998).

3. Results

3.1. Detection of POMC mRNA in the rat mesocorticolimbic system by RT-PCR

In order to demonstrate the presence of POMC mRNA in the mPFC, the NAcc and the VTA, we used a RT-PCR assay. As expected, we found a 94 bp amplification product from all brain regions studied. The appropriate negative controls were included. Omission of reverse transcriptase resulted in no amplification product (Fig. 4a), indicating that genomic DNA or

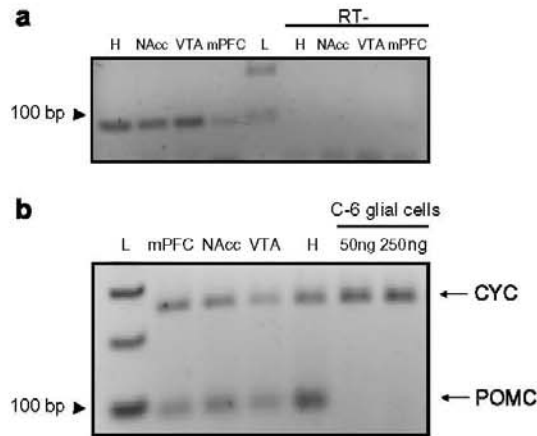


Fig. 4. RT-PCR negative controls using total RNA from rat brain regions and C-6 glial cells. Total RNA obtained from different brain regions was added to the RT reaction mix in the presence or absence (RT-) of RT enzyme and PCR was performed as described in Section 2 (a). In addition, cDNA was obtained by RT reaction from total RNA of different brain regions and C-6 glial cells and PCR was carried out using POMC 1 and cyclophilin (CYC) primers simultaneously (b). Experiments using 50 and 250 ng of cDNA from total RNA of C-6 glial cells are shown. Gel photographs show a 94 bp PCR product. H = hypothalamus; L = molecular size marker; mPFC = medial prefrontal cortex; NAcc = nucleus accumbens; VTA = ventral tegmental area.

cDNA contamination does not account for the 94 bp signal. The other negative control was performed using total RNA extracted from the rat glial C-6 cell line. No PCR amplification products were observed from two independent cultures of the glial C-6 cell line. The gel from one of these experiments is shown in Fig. 4b. The same result was obtained when two different cDNA concentrations (50 and 250 ng) were used in the PCR (Fig. 4b). These results indicate that POMC mRNA is present in the studied areas of the mesocorticolimbic system.

To determine the relative concentrations of POMC mRNA in the mPFC, the NAcc and the VTA, we performed a semi quantitative protocol. Samples obtained from the left and right sides of the mPFC and the NAcc, as well as from the whole VTA and H were studied. Amplification reactions were simultaneously carried out using specific primers for POMC and cyclophilin. Gel electrophoresis of these amplification products is shown in Fig. 5. The intensity of the POMC-PCR product band obtained from the hypothalamus was stronger than that from the other brain regions. The cyclophilin PCR product band showed a similar intensity in all brain regions. Concentrations of POMC-PCR products were calculated relative to the hypothalamus (100%). POMC mRNA levels in the mPFC were $21.63 \pm 2.7\%$ ($n = 3$) and $27.02 \pm 0.7\%$ in the NAcc ($n = 3$). POMC mRNA levels in the VTA were $31.4 \pm 7.7\%$ ($n = 3$) of those present in the hypothalamus. Thus, similar low levels of POMC-PCR products were detected in all of the mesocorticolimbic rat brain areas studied in comparison to the hypothalamus.

Since the presence of a 5' POMC mRNA truncated form has been reported in several rat brain tissues (Grauerholz et al., 1998), we have performed additional experiments to confirm the presence of the full-length POMC mRNA using the POMC 2 primers. As expected, we found a 678 bp amplification product in all brain regions studied (Fig. 6). The same above-mentioned negative controls were included (data not shown), indicating that genomic DNA or cDNA contamination does not account for the 678 bp signal. No PCR amplification products were observed from cDNA obtained from the glial C-6 cell line.

3.2. Distribution of POMC mRNA in the mesocorticolimbic system

POMC mRNA distribution in brain sections was studied by in situ hybridization. POMC mRNA was easily detected in the hypothalamus due to the high con-

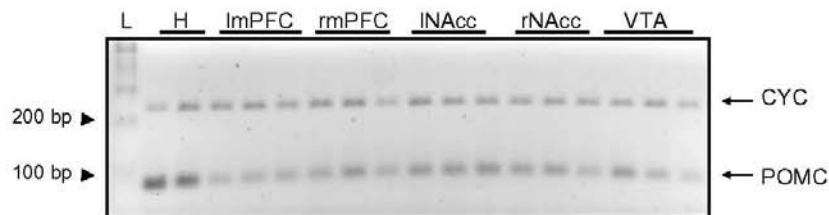


Fig. 5. Detection of POMC mRNA by RT-PCR in rat brain regions. Total RNA was extracted from different brain regions of the rat, cDNA obtained by RT reaction and PCR performed as described in Section 2. Gel photograph shows PCR products from the simultaneous amplification of POMC (94 bp product) and cyclophilin (CYC). Two (hypothalamus) or three (ventral tegmental area) different samples are shown. Samples from the left and right sides of the medial prefrontal cortex and the nucleus accumbens are also shown. H = hypothalamus; L = molecular size marker; lmPFC = left medial prefrontal cortex; lNAcc = left nucleus accumbens; rmPFC = right medial prefrontal cortex; rNAcc = right nucleus accumbens; VTA = ventral tegmental area.

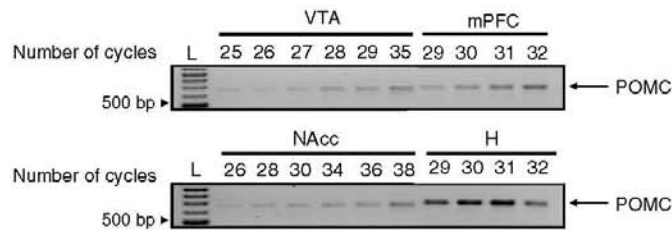


Fig. 6. PCR amplification of full-length POMC at different number of cycles. Total RNA was extracted from different brain regions, cDNAs obtained by RT reaction and PCR performed as described in Section 2. Gel photographs show a 678 bp PCR product obtained from the hypothalamus (H), the nucleus accumbens (NAcc), the ventral tegmental area (VTA) and the medial prefrontal cortex (mPFC) by increasing the number of cycles. L = Molecular size marker.

centrations present in this brain area, as previously reported (Watson and Akil, 1979; Civelli et al., 1982). The POMC hybridization signal in the NAcc was evident at 1 week of film exposition (Fig. 7e and f) and was similar to that reported by Kinoshita et al. (2004). In contrast, a weak POMC hybridization signal was observed in the mPFC, the NAcc and the VTA. Due to the low levels of expression of POMC mRNA, we exposed the films during 12 weeks. In situ hybridization shows an evenly distribution of POMC mRNA along layers II to VI of the frontal cortex, layer I showing the weakest signal (Fig. 7a and b). In the NAcc, we found a faint POMC hybridization signal in both the core and shell regions (Fig. 7c and d). The VTA was the brain region with the lowest POMC hybridization signal (Fig. 7g and h). Non-specific hybridization performed in parallel sections is shown in Fig. 7b, d, f, and g. The POMC mRNA distribution observed by in situ hybridization is in agreement with our results obtained by the RT-PCR technique.

On the other hand, in our in situ hybridization study we have also noticed that other brain areas show the POMC hybridization signal, most of which have been reported to contain this mRNA (Watson and Akil, 1979; Civelli et al., 1982; Grauerholz et al., 1998). As the PFC, the anterior olfactory nucleus shows a weak signal (Fig. 7a). POMC mRNA is also present in the caudate-putamen (CP) and a stronger signal is evident in the cingulate, motor and piriform cortices (Fig. 7c). The auditory, retrosplenial agranular, secondary visual and entorhinal cortices, the hippocampus and the *substantia nigra pars compacta* clearly show a POMC mRNA hybridization signal (Fig. 7g). Films exposed for 1 week show similar hybridization signals in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and the central and basolateral nuclei of the amygdala (Fig. 7e). Except for the NAcc, the stronger hybridization signals were observed in the piriform cortex and the hippocampus (Fig. 7c, e and g), in agreement with previous data (Salih et al., 1979; Grauerholz et al., 1998).

4. Discussion

POMC mRNA is synthesized in several regions of the rat brain, with highest concentrations in the NAcc of the hypothalamus, followed by the NST (Civelli et al., 1982; Bronstein et al., 1992). Other brain areas have been shown to contain low levels of POMC mRNA, such as the amygdala, the striatum, the hippocampus, the cerebral cortex and the cerebellum (Civelli et al., 1982; Grauerholz et al., 1998). Immunocytochemical studies have revealed the presence of different POMC processing products in several areas, such as the hypothalamus, the amygdala, the hippocampus, the NAcc, the thalamus, the midbrain, various cortical regions, and the NST (Moldow and Yalow, 1978; Salih et al., 1979; Akil et al., 1984; Khachaturian et al., 1985; Emeson and Eipper, 1986; Mansour et al., 1988), suggesting that these areas may also contain the POMC mRNA. Therefore, the aim of the present work was to demonstrate the presence of POMC mRNA in the mPFC, the NAcc and the VTA, regions of the mesocorticolimbic system involved in reward and motivated behaviours.

We have shown that RT-PCR amplification with POMC 1 and POMC 2 pairs of primers, specific for the rat POMC mRNA, results in PCR products of the expected sizes (94 and 678 bp, respectively), indicating that the mPFC, the NAcc and the VTA contain POMC mRNA. The obtained PCR products were not the result of amplification of genomic DNA or cDNA contamination, since the omission of reverse transcriptase from the RT reaction showed no amplification products. Moreover, POMC mRNA was not detected in samples obtained from the rat glial C-6 cell line, in which the presence of POMC mRNA has not been described. POMC mRNA expression was similar in the mPFC, the NAcc and the VTA. The relative concentration of POMC mRNA in these areas is approximately 26.7% of that found in the hypothalamus, the brain region with the highest levels of POMC mRNA, as reported by Civelli et al. (1982) and Grauerholz et al. (1998). Furthermore, in situ hybridization experiments showed that

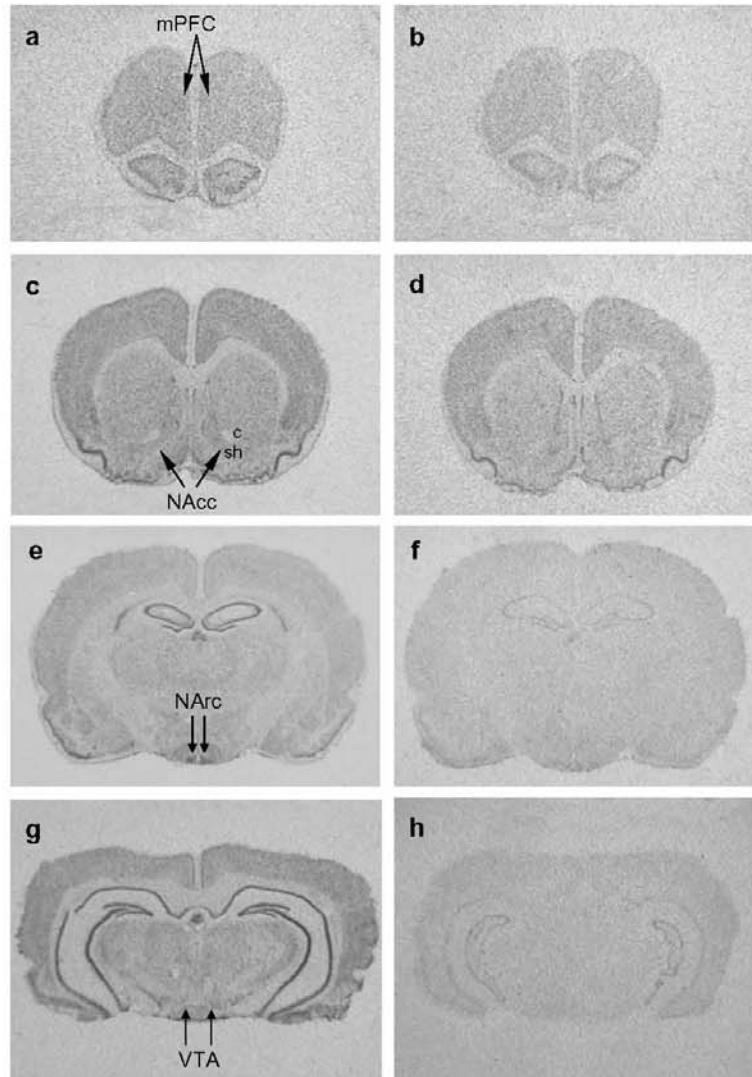


Fig. 7. POMC mRNA expression in rat brain detected by in situ hybridization. POMC in situ hybridization was performed as described in Section 2. Film photographs show rostro-caudal views of the hybridization POMC signal in the medial prefrontal cortex (a, b), the nucleus accumbens (c, d), the arcuate nucleus of the hypothalamus (e, f) and the ventral tegmental area (g, h). Non-specific hybridization signal is shown in each region (b, d, f, and h). Film exposition for the hypothalamus was 1 week, whereas 12 weeks were needed for the other brain regions. c = core region of the nucleus accumbens; H = hypothalamus; mPFC = medial prefrontal cortex; NAcc = nucleus accumbens; sh = shell region of the nucleus accumbens; VTA = ventral tegmental area.

POMC mRNA was homogeneously distributed in the mPFC, the NAcc and the VTA and levels of this mRNA were low in comparison with those found in the hypothalamus. POMC mRNA in the hypothalamus was mainly concentrated in the ventral area of the NArc, as previously reported (Magoul et al., 1994). These findings are in agreement with our results obtained by RT-PCR and demonstrate that the mPFC, the NAcc and

the VTA express low levels of POMC mRNA. Whether the low POMC mRNA hybridization signal observed in these regions is due to low expression of POMC mRNA along these structures or to a higher expression in a small number of POMC mRNA-containing neurons is at present unknown.

The presence of POMC mRNA in the mPFC and VTA had not been previously demonstrated, probably

because these structures express low levels of this mRNA. High sensitivity mRNA detection techniques, such as the RNase protection assay (RPA), have been used to investigate the presence of POMC mRNA in discrete brain areas. However, in some cases, this technique failed to demonstrate the presence of POMC mRNA in areas that subsequently were shown to contain this mRNA by the RT-PCR technique. For instance, Civelli et al. (1982), using a 144 bp probe in a solution hybridization assay with a sensitivity of 1 pg POMC mRNA/ μ g poly (A), demonstrated the presence of this mRNA in the rat hypothalamus and amygdala, but not in the midbrain-striatum and cerebellum. Plata-Salamán et al. (2000), using a 320 bp riboprobe in a solution hybridization assay, detected POMC mRNA in the rat hypothalamus but not in the amygdala, the hippocampus and the parietal, prefrontal and piriform cortices. In comparison, Zhou et al. (1996), using a 538 bp probe, detected POMC mRNA in the amygdala. Since the sensitivity of RPAs depends on the length of the probe, the reported differences may be explained by probe size. However, other factors, such as quantity of total RNA, utilization of poly (A) RNA, and differences in tissue dissections may also contribute to explain these discrepancies. In contrast, Grauerholz et al. (1998), using the RT-PCR technique, demonstrated that the rat cortex, the striatum and the cerebellum express low levels of POMC mRNA, in comparison with the caudal medulla and the hypothalamus. Using the RT-PCR technique, we have demonstrated that the mPFC, the NAcc and the VTA also express POMC mRNA. Our findings are in agreement with results showing the expression of POMC promoter-derived enhanced green fluorescence protein (EGFP) in several areas of the mouse brain, such as the mPFC, the NAcc and the VTA (Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) project), indicating that transcription of the POMC gene is occurring in these brain areas.

The presence of POMC mRNA in the mPFC, the NAcc and the VTA has important functional implications, since the synthesis of POMC-derived peptides and their subsequent release and interaction with opioid receptors could represent important regulatory events related to the activity of the DAergic mesocorticolimbic system, which is involved in motivated and rewarding behaviours elicited by natural reinforcers (Wise and Rompre, 1989; Kalivas and Volkow, 2005) and drugs of abuse (Di Chiara and Imperato, 1988; Koob and Bloom, 1988; Di Chiara et al., 1996). POMC-derived peptides (i.e., β -END) produced by neurons in this pathway could participate in the positive and negative reinforcing effects of several drugs of abuse. Thus, the effects exerted by these peptides at the DAergic mesocorticolimbic system might not be exclusively attributed to inputs from the NAcc of the hypothalamus but also to

local opioidergic (POMC-derived) projections in areas of this pathway.

POMC mRNA in the mPFC, the NAcc, and the VTA could lead to the synthesis and processing of the POMC proteic precursor, which could originate several biologically active peptides. In agreement with this hypothesis, several studies have shown that the NAcc, the amygdala, the hippocampus, the striatum and the midbrain contain various POMC-derived peptides, such as ACTH, α -MSH and β -END (Rossier et al., 1977; Moldow and Yalow, 1978; Dennis et al., 1983; Mansour et al., 1988). In addition, dissociated cells in culture from the rat cortex and the amygdala are able to release β -END and ACTH (Kapcala, 1988). Furthermore, these brain regions also contain the pro-convertases 1 and 2 (PC1 and PC2) (Schafer et al., 1993), enzymes involved in the processing of the POMC precursor, which may originate β -END, ACTH and α -MSH, among others (Benjannet et al., 1991; Thomas et al., 1991). Since the differential processing of the POMC precursor has been reported in the hypothalamus (Emeson and Eipper, 1986) and the anterior and intermediate lobes of the pituitary (Mizuno and Matsuo, 1994), differential processing of this precursor could also occur in the mPFC, the NAcc and the VTA.

In conclusion, we have shown that the mPFC, the NAcc and the VTA of the rat express low levels of POMC mRNA in comparison to those found in the hypothalamus. The specific localization of POMC mRNA neuronal bodies and their projections is an important issue of study that could contribute to understand the functional implications of POMC-derived peptides in these regions. Furthermore, research on the differential processing of the POMC precursor in these regions is noteworthy, since the originated peptides may be involved in different biological functions. Finally, the possibility of the existence of different forms of POMC mRNA in these brain areas should also be investigated.

Acknowledgements

We thank J.M. Pérez and S.R. Mejía for technical assistance. We also thank Dr. P. Joseph-Bravo and Dr. J.L. Charli for providing the funds and facilities at the Instituto de Biotecnología (UNAM) for the RT-PCR determinations. The rat glial C-6 cell line was kindly provided by Dr. H. Pasantes-Morales, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (43503-Q to Dr. P. Joseph-Bravo and 34359-N to Dr. M. Méndez). M. Leriche is a Ph.D., student at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received a fellowship from CONACyT.

References

- Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., Walker, J.M., 1984. Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 223–255.
- Amalric, M., Cline, E.J., Martinez Jr., J.L., Bloom, F.E., Koob, G.F., 1987. Rewarding properties of beta-endorphin as measured by conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)* 91, 14–19.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M., Seidah, N.G., 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving pro-opiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3564–3568.
- Bronstein, D.M., Schafer, M.K., Watson, S.J., Akil, H., 1992. Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res.* 587, 269–275.
- Civelli, O., Birnberg, N., Herbert, E., 1982. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J. Biol. Chem.* 257, 6783–6787.
- Cuello, A.C., Priestley, J.V., Sofroniew, M.V., 1983. Immunocytochemistry and neurobiology. *Q. J. Exp. Physiol.* 68, 545–578.
- Danielson, P.E., Forss-Petter, S., Brow, M.A., Calavetta, L., Douglass, J., Milner, R.J., Sutcliffe, J.G., 1988. p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7, 261–267.
- Dennis, M., Seidah, N.G., Chretien, M., 1983. Regional heterogeneity in the processing of pro-opiomelanocortin in rat brain. *Life Sci.* 33, 49–52.
- Di Chiara, G., Acquas, E., Tanda, G., 1996. Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: the dopamine-opioid link. *Alcohol* 13, 13–17.
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5274–5278.
- Drouin, J., Chamberland, M., Charron, J., Jeannotte, L., Nemer, M., 1985. Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Lett.* 193, 54–58.
- Emeson, R.B., Eipper, B.A., 1986. Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus. *J. Neurosci.* 6, 837–849.
- Grauerholz, B.L., Jacobson, J.D., Handler, M.S., Millington, W.R., 1998. Detection of pro-opiomelanocortin mRNA in human and rat caudal medulla by RT-PCR. *Peptides* 19, 939–948.
- Herz, A., 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 129, 99–111.
- Joseph, S.A., Michael, G.J., 1988. Efferent ACTH-IR opiocortin projections from nucleus tractus solitarius: a hypothalamic deafferentation study. *Peptides* 9, 193–201.
- Kalivas, P.W., Volkow, N.D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413.
- Kapcala, L.P., 1988. Stimulated release of immunoreactive adrenocorticotropin and beta-endorphin from extrahypothalamic brain. *Neuroendocrinology* 47, 50–54.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Schäfer, M.K.-H., Watson, S.J., 1985. Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Neurosci.* 8, 111–119.
- Kiefer, F., Wiedemann, K., 2004. Neuroendocrine pathways of addictive behaviour. *Addict. Biol.* 9, 205–212.
- Kinoshita, H., Harbuz, M.S., Nishiguchi, M., Ouchi, H., Minami, T., Utsumi, T., Motomura, H., Hishida, S., 2004. High alcohol preferring (HAP) and low alcohol preferring (LAP) rats show altered pro-opiomelanocortin (POMC) messenger RNA expression in the arcuate nucleus. *Alcohol Alcohol.* 39, 406–409.
- Koob, G.F., Bloom, F.E., 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242, 715–723.
- Lewis, M.E., Sherman, T.G., Burke, S., Akil, H., Davis, L.G., Arentzen, R., Watson, S.J., 1986. Detection of proopiomelanocortin mRNA by in situ hybridization with an oligonucleotide probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5419–5423.
- Lindblom, J., Haitina, T., Fredriksson, R., Schioth, H.B., 2005. Differential regulation of nuclear receptors, neuropeptides and peptide hormones in the hypothalamus and pituitary of food restricted rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 133, 37–46.
- Magoul, R., Dubourg, P., Kah, O., Tramu, G., 1994. Ultrastructural evidence for synaptic inputs of enkephalergic nerve terminals to target neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 15, 883–892.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 11, 308–314.
- Méndez, M., Morales-Mulia, M., 2006. Ethanol exposure differentially alters pro-enkephalin mRNA expression in regions of the meso-corticolimbic system. *Psychopharmacology* 189, 117–124.
- Mizuno, K., Matsuo, H., 1994. Processing of peptide hormone precursors. In: Imura, H. (Ed.), *The Pituitary Gland*. Raven Press, New York, pp. 153–178.
- Moldow, R., Yalow, R.S., 1978. Extrahypophysial distribution of corticotropin as a function of brain size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 994–998.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C., Cohen, S.N., Numa, S., 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278, 423–427.
- Olive, M.F., Koenig, H.N., Nannini, M.A., Hodge, C.W., 2001. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J. Neurosci.* 21 (1–5), RC184.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J., 1988. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York.
- Palkovits, M., Mezey, E., Eskay, R.L., 1987. Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res.* 436, 323–338.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M.E., Morales, C., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68, 345–354.
- Plata-Salamán, C.R., Ilyin, S.E., Turrin, N.P., Gayle, D., Flynn, M.C., Romanovitch, A.E., Kelly, M.E., Bureau, Y., Anisman, H., McIntyre, D.C., 2000. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75, 248–258.
- Rossier, J., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E., Guillemin, R., 1977. Regional dissociation of beta-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5162–5165.
- Roth-Deri, I., Mayan, R., Yadid, G., 2006. A hypothalamic endorphinic lesion attenuates acquisition of cocaine self-administration in the rat. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16, 25–32.
- Salih, H., Panerai, A.E., Friesen, H.G., 1979. Cellular distribution of beta-endorphin-like substance in the rat pituitary and brain. *Life Sci.* 25, 111–117.
- Schafer, M.K., Day, R., Cullinan, W.E., Chretien, M., Seidah, N.G., Watson, S.J., 1993. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 13, 1258–1279.
- Schwartzberg, D.G., Nakane, P.K., 1983. ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res.* 276, 351–356.

- Shippenberg, T.S., Bals-Kubik, R., Herz, A., 1987. Motivational properties of opioids: evidence that an activation of delta-receptors mediates reinforcement processes. *Brain Res.* 436, 234–239.
- Solinas, M., Zangen, A., Thiriet, N., 2004. Beta-endorphin elevations in the ventral tegmental area regulate the discriminative effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3183–3192.
- Spanagel, R., Herz, A., Bals-Kubik, R., Shippenberg, T.S., 1991. Beta-endorphin-induced locomotor stimulation and reinforcement are associated with an increase in dopamine release in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 104, 51–56.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2046–2050.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1990. The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 55, 1734–1740.
- The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) Project, NINDS Contract No. N01NS02331. The Rockefeller University, New York, NY.
- Thomas, L., Leduc, R., Thorne, B.A., Smeekens, S.P., Steiner, D.F., Thomas, G., 1991. Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of neuroendocrine processing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5297–5301.
- Tregear, G.W., Coghlan, J.P., 1980. Enkephalin, endorphin, and the opiate receptor. *Circ. Res.* 46, I142–I148.
- Watson, S.J., Akil, H., 1979. The presence of two alpha-MSH positive cell groups in rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 58, 101–103.
- Wise, R.A., Rompre, P.P., 1989. Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* 40, 191–225.
- Zaheer, A., Zhong, W., Lim, R., 1995. Expression of mRNAs of multiple growth factors and receptors by neuronal cell lines: detection with RT-PCR. *Neurochem. Res.* 20, 1457–1463.
- Zhou, Y., Spangler, R., LaForge, K.S., Maggos, C.E., Ho, A., Kreek, M.J., 1996. Modulation of CRF-R1 mRNA in rat anterior pituitary by dexamethasone: correlation with POMC mRNA. *Peptides* 17, 435–441.

Efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -endorfina en regiones discretas del cerebro de la rata.

Para investigar el curso temporal del efecto del alcohol medimos la concentración de β -endorfina en el M y el NAcc+S 30 minutos, 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración de 2.5 g/kg de etanol o agua por vía intragástrica. No detectamos ningún cambio significativo en esta etapa del estudio (Figura 6 A y B). Sin embargo, en el NAcc+S notamos una tendencia al incremento de los niveles de β -endorfina entre 30 min y 2 h después de la administración. Se observó la misma tendencia en el M una hora después, por lo cual elegimos 1 h para los estudios posteriores. Dado que en este primer experimento utilizamos disecciones relativamente gruesas, existe la posibilidad de que efectos de la droga localizados en subregiones específicas pudieran haber sido enmascarados. Consecuentemente, realizamos disecciones más finas (i.e. CPF, NAcc, VTA, SN y H).

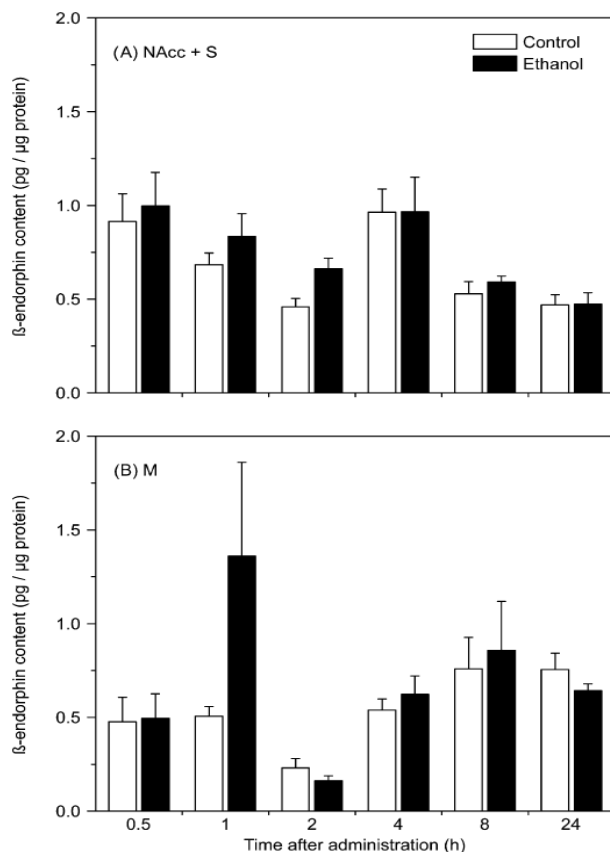


Figura 6. Efecto de la administración aguda de etanol sobre el contenido de β -endorfina en regiones del cerebro de la rata. Se administró una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg i.g.) a los roedores y se sacrificaron a los 30 min, 1, 2, 4, 8 o 24h después del tratamiento. La cuantificación de β -endorfina se llevó a cabo por RIA. El curso temporal de los efectos del alcohol sobre el contenido del péptido se muestran en A para el NAcc+S y en B para el M. Los datos representan la media \pm el error estándar de 5 a 7 animales por grupo. NAcc+S= Núcleo accumbens + Septum y M= Mesencéfalo.

La administración de una dosis aguda de etanol disminuyó en un 26% el contenido de β -endorfina en el hipotálamo 1 h después de la administración, pero no alteró los niveles del péptido en el ATV, NAcc, CPF o la SN (Figura 7).

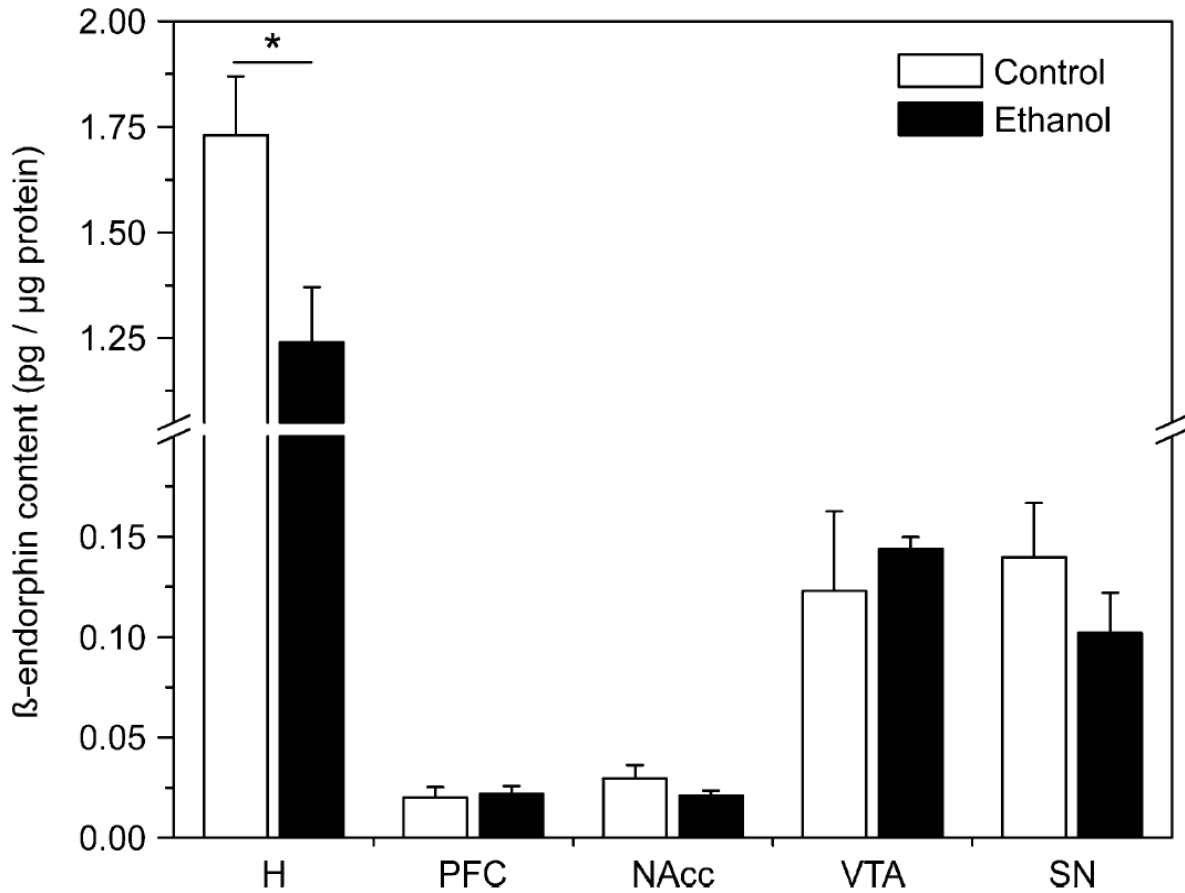


Figura 7. Efecto de una dosis aguda de etanol sobre el contenido de β -endorfina en el hipotálamo, la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el ATV y la SN. Se administró una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg i.g.) a los animales y fueron sacrificados 1h después. La cuantificación de β -endorfina se llevó a cabo por RIA. Los datos representan la media \pm el error estándar de 4 a 8 animales por grupo. H= Hipotálamo, PFC= Corteza prefrontal, NAcc= Núcleo Accumbens, VTA= Área tegmental ventral, SN= Substancia nigra. * $p < 0.05$.

Efecto del consumo crónico de etanol sobre el contenido de β -endorfina y la unión de $[H^3]$ -DAMGO al receptor opioide mu en regiones del cerebro de la rata.

Con el objetivo de investigar el efecto del tratamiento crónico con alcohol sobre el contenido de β -endorfina y la unión de $[H^3]$ -DAMGO utilizamos 4 grupos de animales, etanol (E), sacarosa (S), agua (A) y ad libitum o control (C). El tratamiento crónico con alcohol no alteró el contenido de β -endorfina en ninguna de las regiones estudiadas (Figura 8). En contraste, la administración crónica de sacarosa aumentó selectivamente el contenido del péptido en el NAcc y la SN (Figura 8). El consumo crónico de etanol no modificó la unión de $[H^3]$ -DAMGO en la CPF, el NAcc, o el ATV (ver Leriche y Méndez 2010).

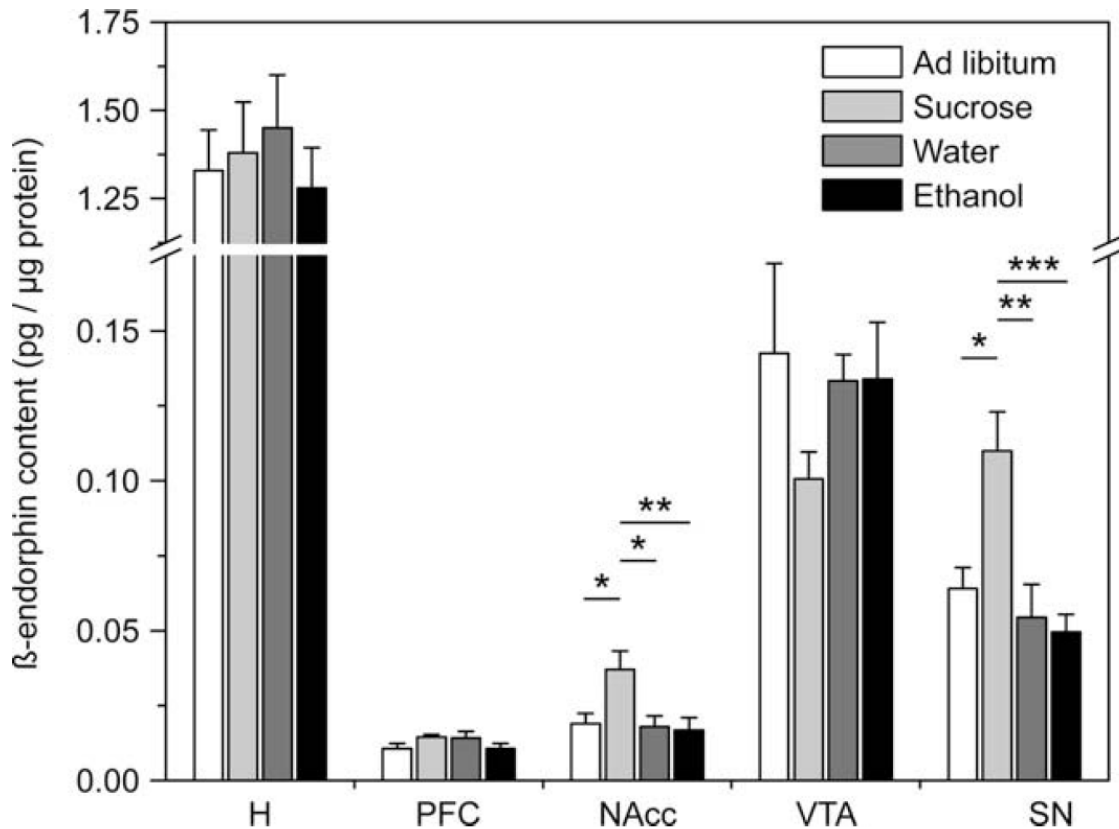


Figura 8. Efecto del tratamiento crónico de etanol sobre el contenido de β -endorfina en el hipotálamo, la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el ATV y la SN. Los animales recibieron el tratamiento crónico descrito en los métodos y la cuantificación de β -endorfina se llevó a cabo por RIA. Los datos representan la media \pm el error estándar de 5 a 10 animales por grupo. H= Hipotálamo, PFC= Corteza prefrontal, NAcc= Núcleo Accumbens, VTA= Área tegmental ventral, SN= Substancia nigra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.



Ethanol exposure selectively alters β -endorphin content but not [^3H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain

M. Leriche, M. Méndez*

Departamento de Neuroquímica, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Calzada Médico-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2009

Accepted 25 November 2009

Available online 23 December 2009

Keywords:

Ethanol

Opioid peptides

β -Endorphin

Mu opioid receptor

Dopaminergic mesocorticolimbic system

Hypothalamus

Sucrose

ABSTRACT

The dopaminergic mesocorticolimbic system plays an important role in the reinforcing effects of ethanol. Opioid peptides modulate the activity of this system and have been suggested to mediate, at least in part, the reinforcing properties of ethanol. Thus, beta-endorphin (β -END) could participate in the development of ethanol reinforcement and addiction. The aim of this work was to investigate the acute and chronic ethanol effects on β -END content in regions of the mesolimbic system and to examine if chronic ethanol treatment alters ligand binding to mu opioid receptor (μ OR). Male Wistar rats received a single acute ethanol dose of 2.5 g/kg or water by intra-gastric administration. For chronic ethanol treatment experiments, one group of rats was given ethanol (10% v/v solution) to drink, two groups were given equivalent volumes of sucrose (14.14% isocaloric solution) or water, respectively, and a fourth group had ad libitum access to food and water. Treatment was followed for 4 weeks. Beta-endorphin content in brain regions was quantified by radioimmunoassay and ligand binding studies to μ OR were performed by quantitative autoradiography using 8 nM [^3H]-DAMGO as radioligand. Acute ethanol decreased β -END content in the hypothalamus (26%) 1 h after administration. No ethanol effects were observed in the midbrain, ventral tegmental area, substantia nigra, nucleus accumbens, nucleus accumbens-septum and prefrontal cortex. Chronic ethanol treatment neither changed β -END levels nor [^3H]-DAMGO binding to mu opioid receptors in any of the regions studied. However, β -END levels in the sucrose group were significantly increased in the nucleus accumbens and substantia nigra, in comparison to all other groups. These findings suggest that different neural mechanisms and specific brain regions may be involved in the reinforcing effects of ethanol and sucrose.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The dopaminergic mesocorticolimbic system plays a central role in the reinforcing effects of drugs of abuse, including alcohol (ethanol). Besides dopamine (DA), several other neurotransmitters have been linked to the neurobiological actions of alcohol. For instance, γ -aminobutyric acid (GABA) has been associated with the anxiolytic and sedative effects of ethanol, whereas glutamatergic transmission is related to the memory impairment and lack of coordination caused by the drug (Vengeliene et al., 2008). Opioid peptides, particularly β -endorphin (β -END) and enkephalins, have been suggested to mediate, at least in part, the reinforcing properties of ethanol (Herz, 1997; Vengeliene et al., 2008). This process may occur through the ethanol-induced activation of endogenous opioidergic pathways (Herz, 1997). Growing evidence indicates that the ethanol-induced activation, and the resulting neuroadaptations of opioidergic systems, is essential for the acquisition and

maintenance of alcohol drinking behavior. For example, naltrexone, a non-selective opioid receptor antagonist, attenuates the acquisition of alcohol drinking behavior (Phillips et al., 1997; Davidson and Amit, 1997). In addition, it has been consistently shown that selective mu (μ) and delta (δ) opioid receptor antagonists (such as β -funaltrexamine or D-Pen-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂, and naltrindole), as well as the non-selective receptor antagonists naloxone and naltrexone, diminish voluntary ethanol consumption in a wide variety of experimental animal paradigms (Stromberg et al., 1998; Hyytiä and Kianmaa, 2001; Cichelli and Lewis, 2002). Naltrexone is helpful for the treatment of alcoholism in humans, since this compound exerts a reduction of craving in abstinent alcohol-dependent individuals and decreases pleasure associated with subsequent ethanol intake (Volpicelli et al., 1992; O'Malley et al., 1992). However, naltrexone is particularly effective in heterozygous individuals (Asp40/Asn40) for the mu opioid receptor gene, but not in homozygous individuals (Asp40/Asp40) (Anton et al., 2008). Thus, activation of μ and δ opioid receptors appears to be important or even necessary for the reinforcing effects of ethanol.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 41 60 50 91; fax: +52 55 55 13 37 22.
E-mail address: ubach@imp.edu.mx (M. Méndez).

The relationship between opioid peptides and the activity of dopaminergic (DAergic) systems has been investigated in detail by several groups. Beta-endorphin has a stimulatory effect on DA release from the nucleus accumbens (NAcc) through activation of μ and/or δ opioid receptors (Spanagel et al., 1990). Additionally, activation of μ and kappa (κ) receptors regulates DA release in this region. Activation of μ receptors in the ventral tegmental area (VTA) increases DA release from the NAcc, whereas κ receptor activation in the NAcc decreases DA release in this nucleus (Spanagel et al., 1992). Thus, some ethanol effects on opioidergic systems could influence or modulate DAergic transmission in brain.

Several studies have investigated the role of opioidergic systems in numerous animal models, including alcohol-preferring and non-preferring lines of rodents. These studies found intrinsic differences in β -END and Met-enkephalin (Met-enk) content, their mRNA precursors, and opioid receptors between these rodent lines (Blum et al., 1982; Gianoulakis and Gupta, 1986; Ng et al., 1996; Fadda et al., 1999; Guitart-Masip et al., 2006). Nevertheless, these differences are distinctly expressed, depending on the brain region and the rodent line or strain studied (Blum et al., 1982; Gianoulakis and Gupta, 1986; Ng et al., 1996; Fadda et al., 1999; Guitart-Masip et al., 2006). Some studies have shown that the β -endorphinergic and enkephalinergic systems of alcohol-preferring rodents exhibit an enhanced sensitivity to ethanol's effects, in comparison with their non-preferring counterparts (De Waele et al., 1992; Li et al., 1998). For instance, release of β -END from the hypothalamus of the alcohol-preferring C57BL/6 mice after ethanol exposure is significantly higher than that of ethanol avoiding DBA/2 mice (De Waele et al., 1992). In addition, ethanol self-administration is increased in β -END deficient-mice (Grisel et al., 1999), whereas μ opioid receptor knockout mice do not self-administer ethanol (Roberts et al., 2000). Furthermore, humans with an elevated risk of alcoholism have lower basal levels of plasmatic β -END and show a higher increase in peptide concentration in response to ethanol administration, compared with individuals with low risk of alcohol abuse (Gianoulakis et al., 1989). On the other hand, β -END, but not Met-enk plasmatic concentration, is decreased in chronic alcoholics (Vescovi et al., 1992). In summary, these studies indicate that genetic modifications in opioidergic systems could account for the innate preference for ethanol and the high alcohol drinking behavior observed in alcohol-preferring lines of rodents and alcoholic patients.

Ethanol alters the activity of the endogenous opioidergic systems via changes in the expression, processing, and release of opioid peptides, as well as alterations in receptor activity (for review, see Cowen and Lawrence, 1999; Vengeliene et al., 2008; Méndez et al., 2008). Studies regarding the effects of this drug on the β -endorphinergic system have been focused at the neuroendocrine level, while the information concerning ethanol effects on regions of the reward circuit is scarce. Ethanol-induced changes in the β -endorphinergic system have been largely investigated in the most important neuronal group producing this peptide in the brain, the hypothalamus. However, conflicting results have been obtained. Acute ethanol exposure increases (Schulz et al., 1980; Patel and Pohorecky, 1989), decreases (Przewlocka et al., 1990) or does not alter (Seizinger et al., 1983; Rasmussen et al., 1998; Popp and Erickson, 1998) β -END levels in the hypothalamus of Sprague Dawley or Wistar rats. Similarly, results obtained after chronic ethanol treatment are inconsistent. Hypothalamic β -END content has been reported to decrease (Boyadjieva et al., 2001), increase (Patel and Pohorecky, 1989) or remain unchanged (Seizinger et al., 1983) after chronic ethanol exposure. These controversial results could be explained by differences in ethanol dose, duration of drug exposure, brain region dissection, and rodent line or strain studied.

The β -endorphinergic system and μ opioid receptors (μ OR) have been suggested to be crucial in the development of alcohol addiction. However, they have been barely studied in brain regions

belonging to the reward system (Zalewska-Kaszubska and Czarnicka, 2005; Méndez and Morales-Mulia, 2008). Opioidergic transmission in brain regions of the reward circuit in response to ethanol exposure has been investigated during the last years by our group. We have shown that acute ethanol administration transiently alters [3 H]D-Ala², MePhe⁴, Gly-o⁵]enkephalin ([3 H]-DAMGO) binding to μ OR depending on the brain region and time after administration. In the VTA and the shell region of the NAcc, [3 H]-DAMGO binding was, respectively, decreased 0.5 and 1 h after administration, while in the prefrontal cortex (PFC) binding was increased 2 h post-treatment (Méndez et al., 2001). In the present work we investigated the acute and chronic ethanol effects on β -END content in several regions of the DAergic mesocorticolimbic system and examined if chronic ethanol treatment alters [3 H]-DAMGO binding. Since previous studies have provided inconsistent results and have been mainly focused at the neuroendocrine level, we considered important to confirm and extend this information in order to better understand the role of the β -endorphinergic system in ethanol reinforcement.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

Male Wistar rats weighing 200 g (chronic treatment) or 200–300 g (acute treatment) were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 8 AM). Standard rat Purina chow and water were available ad libitum, except where indicated.

2.1.1. Acute ethanol treatment

Acute ethanol administration was performed as described previously (Méndez et al., 2001). Briefly, rats were housed five per cage and divided into three groups: naïve, water and ethanol. The naïve group ($n = 7$) was included as a control of the possible effect of stress induced by the intra-gastric cannula. Naïve rats remained undisturbed in the animal room until sacrifice. The control ($n = 38$) and ethanol ($n = 35$) rat groups were habituated to the administration process by receiving distilled water (5 ml/kg body weight) via an intra-gastric cannula for 7 days. On the following day, rats received either distilled water (5 ml/kg) or ethanol (2.5 g/kg body weight). The ethanol solution was prepared by diluting 2.5 g ethanol in distilled water to a final volume of 5 ml. Animals were sacrificed by decapitation at different time points (30 min, 1, 2, 4, 8 or 24 h) after administration and the brain immediately removed and dissected. For each time point, both control and ethanol-treated groups were made of 5–7 animals and were sacrificed simultaneously (see legend to Fig. 1 for precise number of animals per group). Animals were sacrificed between 10:30 and 12:30 h, except for rats from the 8 and 24 h post-administration groups, which were sacrificed at 18:00 and 15:00 h, respectively. The naïve group was sacrificed at 13:00 h. It is worth to notice that no circadian variations in β -endorphin content have been detected in several areas contained in the NAcc + S and the midbrain (i.e., the septum, the substantia nigra and the central grey) (Kerdelhue et al., 1983) at the time of sacrifice of our study. In the first experiment examining the acute temporal effect of ethanol, we dissected two relatively large regions of brain tissue, the midbrain (M) and the nucleus accumbens-septum (NAcc + S), according to Paxinos and Watson (1998). After determining that 1 h time point was the most appropriate for β -END analysis, a second experiment was conducted in which β -END levels were determined in discrete regions of brain tissue, which included the prefrontal cortex (PFC) (5.2–2.7 mm from Bregma), the nucleus accumbens (NAcc) (2.7–0.48 mm from Bregma), the hypothalamus (H) (–1.6 to –5.2 mm from Bregma), the ventral tegmental area

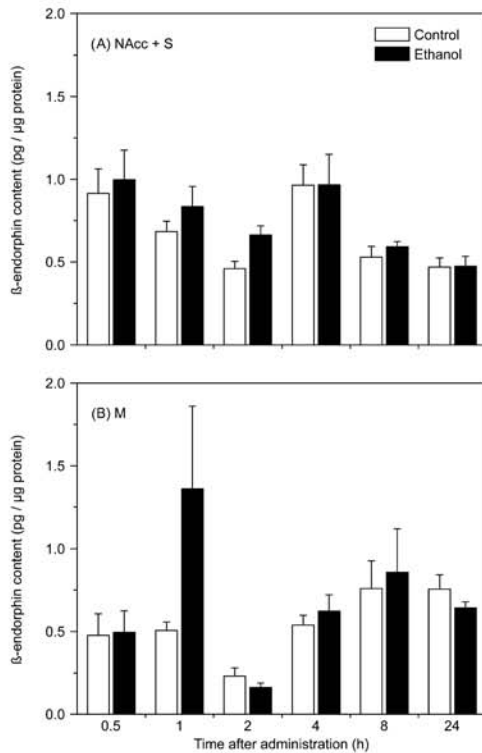


Fig. 1. Effect of acute ethanol administration on β -endorphin content in regions of the rat brain. Animals were administered with a single dose of ethanol (2.5 g/kg i.g.) and sacrificed 30 min, 1, 2, 4, 8, or 24 h after treatment. Beta-endorphin was quantified by RIA in different regions. Ethanol temporal course effects are shown for the nucleus accumbens + septum (NAcc + S) (A) and the midbrain (M) (B). For the NAcc + S, data are the mean \pm SEM of 7 (control) and 6 (ethanol) (0.5 and 1 h), 7 (control and ethanol) (2 h), 5 (control and ethanol) (4 h), 6 (control) and 5 (ethanol) (8 h) and 6 (control and ethanol) (24 h) animals. For the M, data are the mean \pm SEM of 6 (control and ethanol) (0.5 h), 7 (control) and 6 (ethanol) (1 h), 6 (control) and 5 (ethanol) (2 h), 5 (control and ethanol) (4 h), 5 (control) and 6 (ethanol) (8 h) and 7 (control and ethanol) (24 h).

(VTA) and substantia nigra (SN) (−5.2 to −6.8 mm from Bregma). The VTA was dissected using a micron tissue punch of 1 mm diameter. Brain regions were dissected 1 h after water ($n = 7$) or ethanol ($n = 8$) administration and maintained at -70°C until β -END assays were performed.

2.1.2. Chronic ethanol treatment

Rats were housed one per cage and assigned to one of four groups: ethanol (E), sucrose (S) water (W) or ad libitum (A). Fluid and food consumption, as well as rat weight were recorded daily. The ethanol and ad libitum rat groups had free access to food and a 10% ethanol solution (v/v) or water, respectively. The sucrose and water groups were fed with the same amount of food and fluid as that consumed by the E group (isocaloric sucrose solution or water, respectively) the day before. The sucrose solution (14.14%) was employed to substitute the calories given by ethanol. At the beginning of the chronic treatment, animals of the E group showed a slight drop in body weight due to the initial aversion to the ethanol solution. Since food and liquid consumption in the sucrose and water groups was determined by the ethanol group, these animals showed the same pattern in weight variation along time.

After 4 weeks of treatment, the mean weight (in g) \pm SEM of the different groups was as follows: ad libitum 365.7 ± 9.3 , sucrose 300.3 ± 12.4 , water 276 ± 9.1 and ethanol 286.4 ± 8.5 . The last day of treatment, the E group had consumed 68 ± 7.8 ml of alcohol solution (equivalent to 5.4 g of ethanol) and the S group 74 ± 8.9 ml (equivalent to 10.2 g of sucrose), corresponding to 42.7 and 41 kcal, respectively. Two separate chronic ethanol treatments were carried out, one for the β -END content experiments (40 animals) and other for the binding assays (31 animals). After 4 weeks of treatment, animals were sacrificed between 9:30 and 11:00 h (peptide content experiments) or between 10:30 and 12:30 h (binding experiments). After sacrifice, the brains were immediately removed and frozen until further processing. Dissections of specific brain regions (PFC, NAcc, H, VTA, and SN) were performed as described above. For the opioid receptor binding experiments, coronal brain sections (20μ) were obtained in a cryostat, mounted in gelatin-coated slides, and maintained at -70°C until assay.

2.2. Beta-endorphin extraction procedure

Peptide extraction was performed as reported previously (Rasmussen et al., 1998). Briefly, brain regions in 1 N acetic acid were placed in a boiling water bath for 20 min, ultrasonicated, and then centrifuged at 15,000 rpm for 10 min at 4°C . The supernatant was dried under vacuum in a Speed-Vac concentrator (Savant SC110A-115) and stored at -20°C until reconstitution in assay buffer.

2.3. Beta-endorphin radioimmunoassay

The ^{125}I - β -END was obtained by the chloramine T method as described previously (Rees et al., 1971; Deby-Dupont et al., 1983). Briefly, 1 μ g of β -END (Bachem) was labelled using 250 μCi of Na^{125}I and chloramine T. The reaction was stopped 20 s later with sodium metabisulphite. ^{125}I - β -END was separated from free Na^{125}I by gel filtration on Sephadex G-50 (Pharmacia) in 0.05 M sodium phosphate buffer containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.05% sodium azide, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (7 mg/ml) and 0.3% β -mercaptoethanol. The ^{125}I - β -END was preserved at 4°C in the filtration buffer containing 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin (Sigma).

Beta-endorphin was measured by radioimmunoassay (RIA), as directed by the antibody supplier (Bachem), with some modifications. Unknown samples were reconstituted in different volumes of RIA buffer, depending on the size and/or peptide content of the region (i.e., 150 μl VTA, 200 μl NAcc, 350 μl SN and CPF, 1 ml M, NAcc + S and H). Samples from large regions or with high peptide content (e.g., H) were further diluted. Since some brain regions were very small (VTA) or contained very low concentrations of β -END (NAcc) it was necessary to pool homogenates from 1.5 or 2 rats. The β -END standards (100 μl) or the unknown samples were added in triplicate to plastic tubes, followed by the addition of 50 μl of antibody and 100 μl of ^{125}I - β -END (8000 cpm) and the mixture was incubated overnight at 4°C . Fifty microliters of fetal bovine serum (Gibco) and 400 μl of polyethylene glycol 6000 (25%) were added and the mixture was incubated 10 min at -20°C . The bound and free fractions of labelled material were separated by centrifugation at 4000 rpm for 30 min at 4°C . Bound radioactivity in the pellets was measured in a gamma emission counter (Perkin Elmer, Wallac Wizard 1470-001). The β -END antibody was a rabbit anti-rat serum with 100% cross-reactivity with the rat, porcine, horse, camel, bovine and ovine β -END sequence and 40% cross-reactivity with the human peptide. The β -END antibody also showed cross-reactivity with alpha-endorphin (100%) and gamma-endorphin (60%). These two peptides are in very low concentrations in most of the brain regions studied (Verhoef et al., 1982). The β -END antibody used in the present study did

not cross-react with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (human), Met-enkephalin, alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 (ovine). The sensitivity of the assay was 13 pg and the IC50 137 pg. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.3% and 13.1%, respectively.

2.4. Protein quantification

Protein content was determined in homogenates from distinct brain regions as described by Lowry et al. (1951).

2.5. Mu receptor binding assay

Quantitative receptor autoradiography for μ opioid receptors was performed as reported previously (Méndez et al., 2001). Briefly, brain sections were pre-incubated 30 min in 50 mM Tris-HCl buffer, followed by incubation in the same buffer containing 8 nM [3 H]-DAMGO (60 Ci/mmol, NEN-DuPont) for 1 h at 4 °C. For non-specific binding, 10 μ M naloxone was added to the incubation buffer and the signal was subtracted from total radioligand binding. Sections were washed in ice-cold buffer six times (20 s each) and dried. Labelled sections were exposed to tritium-sensitive film (Kodak BioMax MS) for 24 weeks at room temperature. Tritium standards (ARC) were included in the cassettes. Films were developed in Kodak D-19 developer and rapid fixer.

Film autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (Image-Pro Plus Software, Media Cybernetics). Brain structures were identified according to the Paxinos and Watson atlas (1998). The medial prefrontal cortex (mPFC), the PFC, the core and shell regions of the NAcc and the VTA were specifically examined. Four to sixteen optical density (OD) measurements were taken of each brain region from approximately 20 different sections per rat. Optical density measurements of non-specific binding sections were subtracted from those of total binding. Optical densities from the standards were used to plot a calibration curve and a linear regression was applied. Binding in brain regions were calculated by reference to the standard curve and data was expressed as fmol of radioligand bound/mg tissue equivalent.

2.6. Statistics

One-way ANOVA was used to investigate if intra-gastric water administration had an effect on β -END content. In particular, the naïve group was compared with all of the control groups independently from ethanol groups. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze β -END tissue content data in the acute ethanol temporal course experiment, with treatment and time after administration as independent factors. To investigate differences in β -END content between control and ethanol groups 1 h after ethanol administration, the Student's *t*-test for independent samples was applied.

For chronic ethanol treatment experiments, one-way ANOVA was used to analyze the effect of treatment on β -END content, as well as [3 H]-DAMGO binding to μ opioid receptors. The Tukey-HSD test was employed to investigate significant differences between groups.

3. Results

3.1. Effect of acute ethanol administration on β -END content in regions of the rat brain

Beta-endorphin concentrations measured in several brain regions of the rat were similar to those previously reported (Ker-

delhue et al., 1983; Popp and Erickson, 1998). Beta-endorphin content was measured in the NAcc + S (0.65 ± 0.11 pg/ μ g protein, $n = 5$) and the M (0.38 ± 0.13 pg/ μ g protein, $n = 7$) of naïve rats to determine the possible effect of stress induced by the intra-gastric cannula. One-way ANOVA revealed no significant effect of i.g. water administration in the NAcc + S and M when the naïve and water control groups were compared. In all cases *p* values were >0.05 .

To investigate the time course effect of ethanol, β -END content was measured in the NAcc + S and M at different times after administration. Two-way ANOVA showed no significant effect of treatment \times time in the NAcc + S ($F_{(5,72)} = 0.606$, $p < 0.696$), or treatment ($F_{(1,72)} = 2.377$, $p < 0.128$). A significant effect of time was found ($F_{(5,72)} = 9.06$, $p < 0.001$) (Fig. 1A). In the M, a significant effect of time was also found ($F_{(5,70)} = 11.528$, $p < 0.001$). Again, no significant effects of treatment ($F_{(1,70)} = 0.396$, $p < 0.531$) or the interaction between treatment and time ($F_{(5,70)} = 21.182$, $p < 0.329$) were found. Because ethanol showed a trend to increase levels of β -END 0.5–2 h following acute administration (Fig. 1A and B), we choose 1 h as the time point for further investigations. Since the first experiment was performed using large regions of dissected brain, it is possible that localized effects of ethanol on β -END within specific structures could have been masked. Thus, further experiments were conducted in which β -END was assayed in distinct brain regions 1 h after the administration of ethanol (2.5 g/kg). The principal regions of interest were the PFC, NAcc, and VTA. However, the SN, which also contains high concentrations of dopaminergic neurons, and the hypothalamus, in which the highest densities of β -END neurons in the brain are found, were also included.

The main finding was that acute administration of ethanol induced a significant 26% decrease in β -END content in the hypothalamus ($t = 2.619$, $df = 13$, $p < 0.021$) (Fig. 2). This treatment failed to alter peptide content in any of the other brain regions examined (PFC, NAcc, VTA and SN) (Fig. 2).

3.2. Effects of chronic ethanol and sucrose treatments on β -END content in regions of the rat brain

Compared with the ad libitum and water control groups chronic, ethanol exposure failed to induce reliable changes in β -

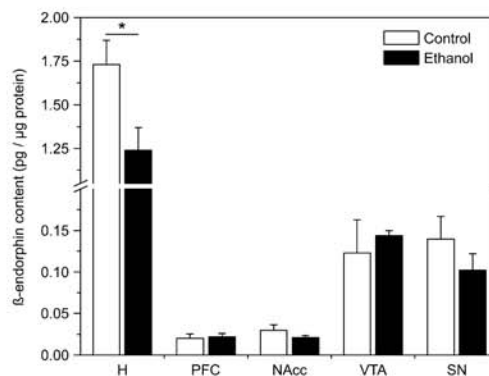


Fig. 2. Effect of acute ethanol administration on β -endorphin content in the rat hypothalamus, prefrontal cortex, nucleus accumbens, ventral tegmental area, and substantia nigra. Animals were administered with a single dose of ethanol (2.5 g/kg i.g.) and sacrificed 1 h after treatment. Beta-endorphin was quantified by RIA. Data are the mean \pm SEM of 7 (H, controls) and 8 (H, ethanol), 7 (PFC, control) and 6 (PFC, ethanol), 5 (NAcc), 4 (VTA), 7 (SN, controls), or 8 (SN, ethanol) animals. H, hypothalamus; NAcc, nucleus accumbens; PFC, prefrontal cortex; SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area. * $p < 0.05$.

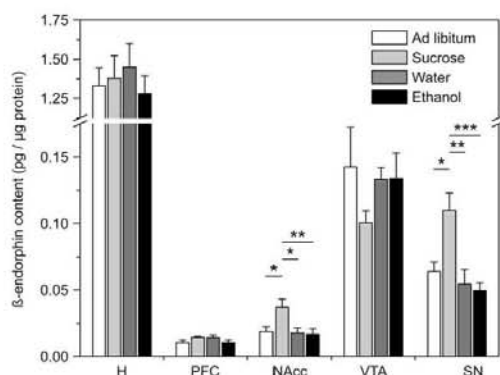


Fig. 3. Effect of chronic ethanol treatment on β -endorphin content in the rat hypothalamus, prefrontal cortex, nucleus accumbens, ventral tegmental area, and substantia nigra. Animals were chronically treated as described in methods and β -endorphin quantified by RIA. A, ad libitum; S, sucrose; W, water; E, ethanol. Data are the mean \pm SEM of 9 (H), 8 (PFC, E group), 9 (PFC, A group), 10 (PFC, S and W groups), 6 (NAcc, E group), 7 (NAcc, A, S and W groups), 5 (VTA), 9 (SN, S and W groups), or 10 (SN, A and E groups) animals. H, hypothalamus; NAcc, nucleus accumbens; PFC, prefrontal cortex; SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

END content in any of the structures examined (H, PFC, NAcc, VTA and SN) (Fig. 3). In contrast, chronic sucrose treatment produced a significant selective increase in β -END content in the NAcc and the SN compared with all other groups (ad libitum, water and ethanol) (Fig. 3).

3.3. Effect of chronic ethanol treatment on [3 H]-DAMGO binding to mu opioid receptors in regions of the rat brain

The anatomical distribution and levels of mu opioid receptors were similar to those previously reported (Mansour et al., 1987; Tempel and Zukin, 1987). [3 H]-DAMGO binding to μ OR in different brain regions was compared between the four experimental groups. No significant differences were found between any of the groups in any of the regions studied (i.e., the PFC, the mPFC, the core and shell regions of the NAcc and the VTA) (Table 1). This study therefore provides no evidence that chronic ethanol treatment can modulate [3 H]-DAMGO binding to μ OR in these brain areas.

4. Discussion

Biochemical and pharmacological evidence suggest that the ethanol-induced activation, and the resulting neuroadaptations of β -endorphinergic systems, is probably essential for the acquisition and maintenance of alcohol drinking behavior (Zalewska-Kaszubska and Czarna, 2005). However, these studies have been mainly focussed at the neuroendocrine level and the effects of this drug in regions of the reward circuit have not been extensively explored. Thus, our interest was to investigate the acute and chronic effects of ethanol on β -END content in regions of the DAergic mesocorticolimbic system. The effect of long-term exposure to the drug was also studied on [3 H]-DAMGO binding to μ OR. The main findings of the present study were: (i) the decreased levels of β -END found in the hypothalamus 1 h after acute ethanol administration; (ii) the selective increase in β -END content in the NAcc and SN in response to chronic exposure to sucrose, but not to ethanol, and (iii) the lack of effect of chronic ethanol treatment on [3 H]-DAMGO binding in the PFC, the NAcc, and the VTA.

We have shown that acute ethanol administration did not significantly alter β -END content in the M and NAcc + S at any time point of a 24 h temporal course. Similarly, Seizinger et al. (1983) demonstrated that an ethanol dose of 2.5 g/kg i.p. does not alter β -END content in the M of Sprague Dawley rats 1 h after administration, although higher ethanol doses (i.e., 3 g/kg) increase peptide content in this brain region (Anwer and Soliman, 1995). Since large dissections could hamper more localized effects of the drug, we investigated if ethanol alters β -END concentration in specific regions of the M and in the NAcc. Acute ethanol did not change β -END content in the VTA and SN 1 h after administration. Thus, ethanol may alter peptide levels in other regions contained in the M such as the central grey, which shows altered opioid peptide levels in rodents selected for ethanol preference (Jamensky and Gianoulakis, 1999; Gianoulakis et al., 1992). On the other hand, acute ethanol administration did not alter peptide levels in the NAcc 1 h after administration. Additionally, acute ethanol did not change β -END content in the PFC, as has been previously shown by Anwer and Soliman (1995) using an ethanol dose of 3 g/kg in Sprague Dawley rats.

Previous studies investigating the acute effects of ethanol on the hypothalamic content of β -END are inconsistent. Acute administration of ethanol doses from 0.91 to 3 g/kg did not alter β -END levels in the hypothalamus 30 min and 1 h after drug exposure in Sprague Dawley rats (Seizinger et al., 1983; Rasmussen et al., 1998; Popp and Erickson, 1998). However, in the same strain, similar ethanol doses (2 and 2.5 g/kg) increased hypothalamic β -END content 20 min and 1 h after drug administration (Schulz et al., 1980; Patel and Pohorecky, 1989). In contrast, we found that acute ethanol administration (2.5 g/kg) in Wistar rats diminishes β -END content in the hypothalamus 1 h after drug exposure. Przewlocka et al. (1990) administered a higher ethanol dose (5 g/kg ethanol, i.g.) to Wistar rats and found a slight decrease (26%) in the hypothalamic β -END concentration 1 h after administration, as we did. Thus, the response of the β -endorphinergic system to ethanol could differ depending on the rodent strain and the experimental protocol. Genetically distinct rodent strains have been reported to exhibit differential sensitivity to the effects of drugs of abuse. For instance, the DAergic mesolimbic system of Sprague Dawley and Wistar rats exhibit important differences in their responsiveness to morphine, since Wistar rats need a larger dose of the drug to produce a significant increase in DA release (Shoaib et al., 1995). On the other hand, several processes could explain the observed decrease in hypothalamic β -END levels. Post-translational processing of the Pro-opiomelanocortin (POMC) precursor could account for the observed effect. A delayed enzymatic processing of the β -END precursor has been reported in the anterior lobe of the pituitary after 2 weeks of ethanol exposure (Seizinger et al., 1983). Additionally, ethanol administration increases β -END release from the hypothalamus (Gianoulakis, 1990), as well as from other brain regions innervated by the arcuate nucleus such as the NAcc and the amygdala (Poplawski et al., 2005; Olive et al., 2001; Marinelli et al., 2003; Lam et al., 2008), which would contribute to reduce peptide levels.

Chronic ethanol effects on opioid peptide systems have been studied in the past using different techniques to administer the drug: liquid diet, intra-gastric, etc. (Seizinger et al., 1983, 1984; Patel and Pohorecky, 1989). However, when sucrose is used to compensate for calories from ethanol, the effects on β -END concentrations are not often compared with an ad libitum control group (Boyadjieva et al., 2001). In the present study, sucrose induced selective increases in β -END levels in the NAcc and SN, when compared to the ad libitum, water and ethanol groups. These changes in β -END concentrations are not due to differences in calorie supply or fluid intake, since no significant differences

Table 1
Effect of chronic ethanol treatment on [³H]-DAMGO binding to mu opioid receptors in regions of the mesocorticolimbic system.

Treatment	Region				Ventral tegmental area (n)
	Prefrontal cortex		Nucleus accumbens		
	Whole (n)	Medial (n)	Core (n)	Shell (n)	
	fmol [³ H]-DAMGO bound/mg tissue				
Ad libitum	31.4 ± 3.7 (8)	35.0 ± 4.4 (8)	28.7 ± 5.2 (6)	37.4 ± 5.5 (6)	12.5 ± 1.9 (7)
Sucrose	25.4 ± 3.9 (8)	32.4 ± 8.7 (8)	31.9 ± 10.2 (7)	37.6 ± 10.7 (7)	12.0 ± 3.0 (8)
Water	31.5 ± 5.3 (7)	33.4 ± 6.4 (7)	34.0 ± 5.7 (6)	45.7 ± 6.6 (7)	17.3 ± 2.2 (7)
Ethanol	37.8 ± 4.9 (8)	38.9 ± 3.8 (8)	33.7 ± 3.9 (6)	39.0 ± 5.9 (7)	16.5 ± 4.0 (6)

were found between the ad libitum, water and ethanol groups. The observed sucrose-induced increase in β -END concentration could be due to elevated levels of its precursor mRNA (POMC) locally in the NAcc and the SN. In this context, the presence of POMC mRNA has been evidenced in these brain regions (Leriche et al., 2007).

Both ethanol and sucrose are well known reinforcers (for review, see Wheeler and Carelli, 2009; Herz, 1997). However, ethanol failed to alter β -END concentrations in the NAcc and SN, suggesting that peptide increases induced by sucrose may be related to palatability. In agreement with this view, highly palatable food has been reported to alter enkephalin and dynorphin expression in the striatum and the arcuate nucleus, respectively (Kelley et al., 2003; Welch et al., 1996). Moreover, our results suggest that β -END plays an important role in the rewarding properties of sucrose. Accordingly, Kelley et al. (2002) have shown that palatability is under opioid modulation in the NAcc. On the other hand, the different effects induced by sucrose and ethanol are expected, since it has been shown that abused substances (i.e., cocaine and ethanol) and natural reinforcers (i.e., food and water) produce a differential activation of distinct populations of NAcc neurons (for review, see Wheeler and Carelli, 2009; Robinson and Carelli, 2008). Thus, mechanisms underlying the effects of abused drugs and natural reinforcers in the NAcc (and possibly other brain regions, such as the SN) could also be distinct, including a differential activation of the β -endorphinergic system, as we have shown.

In contrast to the observed effects in the NAcc and SN, we found that sucrose did not alter β -END content in other brain regions, when compared to all other experimental groups. This is in accordance with the study of Boyadjieva et al. (2001), who found no differences in the hypothalamic β -END content between the sucrose (11.4% as liquid diet) and ad libitum groups after 1–4 weeks of treatment.

Clinical and animal studies indicate that chronic ethanol exposure leads to a dampened neuroendocrine state and β -END deficiency (Richardson et al., 2008; Zalewska-Kaszubska and Czarnicka, 2005). We have shown that chronic ethanol treatment compared to the ad libitum and water groups did not alter β -END concentration in any of the regions studied. In agreement, Schulz et al. (1980) did not find changes in the hypothalamic content of β -END after chronic ethanol exposure. In contrast, other studies have shown increases (Patel and Pohorecky, 1989; Boyadjieva et al., 2001) or decreases (Boyadjieva et al., 2001) in the hypothalamic levels of this peptide. It is worth to notice that 6–10 days of ethanol exposure generally leads to increased levels of hypothalamic β -END (Patel and Pohorecky, 1989; Przewlocka et al., 1990; Boyadjieva et al., 2001), whereas a more prolonged treatment (2–4 weeks) usually does not alter peptide content (the present study; Schulz et al., 1980; Seizinger et al., 1983), or induces a decrease (Boyadjieva et al., 2001). Differences in ethanol dose, brain region dissection, and rodent line or strain studied could also account for the reported differences in ethanol effects.

In contrast to the observed effects on β -END content, chronic ethanol or sucrose treatment did not alter [³H]-DAMGO binding to μ OR in any region studied (i.e., PFC, mPFC, core and shell regions of the NAcc and VTA). Turchan et al. (1999) found that chronic ethanol administration (1–6% for 30 days) decreased [³H]-DAMGO binding in the NAcc. Interestingly, the ethanol-induced decrease in [³H]-DAMGO binding in this structure is maintained 24, 48 and 96 h after the onset of ethanol withdrawal (Turchan et al., 1999), suggesting that chronic ethanol effects on ligand binding to accumbal μ OR are long-lasting. The distinct ethanol concentrations used in both studies could explain the observed differences in ethanol effects. Opioid receptor activation may be particularly sensitive to ethanol dose and time of exposure to the drug (for review, see Méndez and Morales-Mulia, 2008). Our results suggest that chronic ethanol does not alter ligand affinity and/or μ OR density in the studied regions. However, ethanol could decrease the coupling of μ OR to G proteins in some brain regions, as has been reported for the PFC and specific areas of the dentate gyrus and superior and inferior colliculus (Sim-Selley et al., 2002; Saland et al., 2004). Further research is needed in order to elucidate the role of μ OR in the development of ethanol addiction.

In conclusion, the present findings indicate that a decrease in β -END content in the hypothalamus could participate in the early reinforcing effects of ethanol. The acute and chronic effects of ethanol on the β -endorphinergic system are not expressed as changes in β -END concentrations or [³H]-DAMGO binding to μ OR in brain regions of the mesocorticolimbic system. In contrast, increases in β -END levels in the NAcc and the SN could play a role in the reinforcing properties of natural reinforcers (i.e., sucrose). Thus, drugs of abuse and natural reinforcers may exert its actions through different neural mechanisms.

Acknowledgements

The authors are grateful for the excellent technical assistance of J.M. Pérez-Luna, I. Barbosa-Luna, and S.R. Mejía. This work was supported by a Grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 34359-N). M. Leriche received a fellowship from CONACyT and the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Mariana Leriche Vázquez at the Universidad Nacional Autónoma de México.

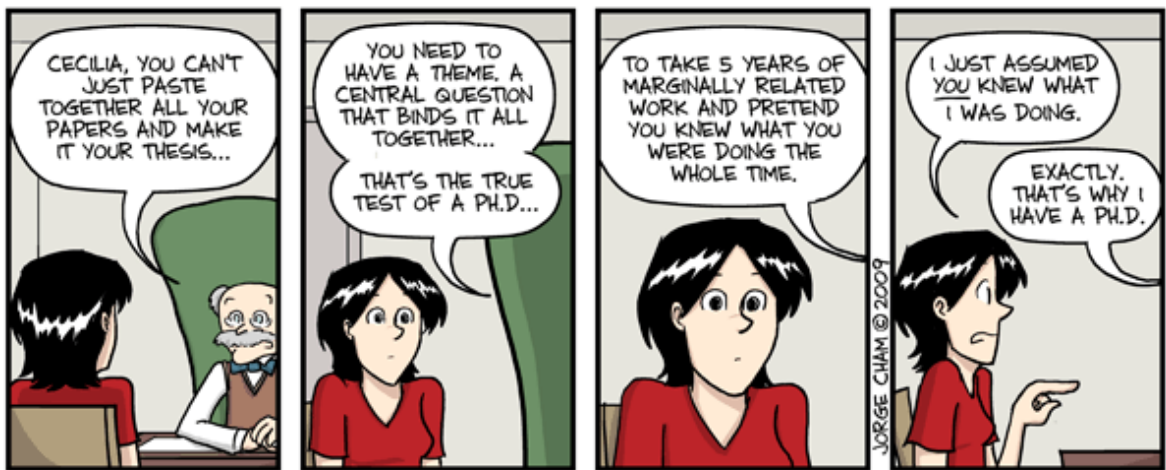
References

- Anton, R.F., Oroszi, G., O'Malley, S., Couper, D., Swift, R., Pettinati, H., Goldman, D., 2008. An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence (COMBINE) study. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 135–144.
- Answer, J., Soliman, M.R., 1995. Ethanol-induced alterations in beta-endorphin levels in specific rat brain regions: modulation by adenosine agonist and antagonist. *Pharmacology* 51, 364–369.

- Blum, K., Briggs, A.H., Delallo, L., Elston, S.F., Ochoa, R., 1982. Whole brain methionine-enkephalin of ethanol-avoiding and ethanol-preferring C57BL mice. *Experientia* 38, 1469–1470.
- Boydjjeva, N., Dokur, M., Advis, J.P., Meadows, G.G., Sarkar, D.K., 2001. Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. *J. Immunol.* 167, 5645–5652.
- Cicchelli, M.J., Lewis, M.J., 2002. Naloxone nonselective suppression of drinking of ethanol, sucrose, saccharin, and water by rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 699–706.
- Cowen, M.S., Lawrence, A.J., 1999. The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23, 1171–1212.
- Davidson, D., Amit, Z., 1997. Naltrexone blocks acquisition of voluntary ethanol intake in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 677–683.
- De Waele, J.P., Papachristou, D.N., Gianoulakis, C., 1992. The alcohol-preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hypothalamic beta-endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding DBA/2 mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 788–794.
- Deby-Dupont, G., Reuter, A.M., Joris, J., Vrindts-Gevaert, Y., Franchimont, P., 1983. Labeling of beta-endorphin and beta-lipotropin with iodine 125. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 177, 259–268.
- Fadda, P., Tronci, S., Colombo, G., Fratta, W., 1999. Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 1296–1305.
- Gianoulakis, C., 1990. Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 180, 21–29.
- Gianoulakis, C., Gupta, A., 1986. Inbred strains of mice with variable sensitivity to ethanol exhibit differences in the content and processing of beta-endorphin. *Life Sci.* 39, 2315–2325.
- Gianoulakis, C., Beliveau, D., Angelogianni, P., Meaney, M., Thavundayil, J., Tawar, V., Dumas, M., 1989. 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, 1097–1109.
- Gianoulakis, C., De Waele, J.P., Kianmaa, K., 1992. Differences in the brain and pituitary beta-endorphin system between the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 16, 453–459.
- Grisel, J.E., Mogil, J.S., Grahame, N.J., Rubinstein, M., Belknap, J.K., Crabbe, J.C., Low, M.J., 1999. Ethanol oral self-administration is increased in mutant mice with decreased beta-endorphin expression. *Brain Res.* 835, 62–67.
- Guitart-Masip, M., Gimenez-Llort, L., Fernandez-Teruel, A., Canete, T., Tobena, A., Ogren, S.O., Terenius, L., Johansson, B., 2006. Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *Eur. J. Neurosci.* 23, 531–540.
- Herz, A., 1997. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 129, 99–111.
- Hyytiä, P., Kianmaa, K., 2001. Suppression of ethanol responding by centrally administered CTOP and naltrindole in AA and Wistar rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 25–33.
- Jamensky, N.T., Gianoulakis, C., 1999. Comparison of the proopiomelanocortin and proenkephalin opioid peptide systems in brain regions of the alcohol-preferring C57BL/6 and alcohol-avoiding DBA/2 mice. *Alcohol* 18, 177–187.
- Kelley, A.E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J., Zhang, M., 2002. Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.* 76, 365–377.
- Kelley, A.E., Will, M.J., Steininger, T.L., Zhang, M., Haber, S.N., 2003. Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure(R)) alters striatal enkephalin gene expression. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2592–2598.
- Kerdelhue, B., Kartesz, M., Pasqualini, C., Reinberg, A., Mezey, E., Palkovits, M., 1983. Circadian variations in beta-endorphin concentrations in pituitary and in some brain nuclei of the adult male rat. *Brain Res.* 261, 243–248.
- Lam, M.P., Marinelli, P.W., Bai, L., Gianoulakis, C., 2008. Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* 201, 261–271.
- Leriche, M., Cote-Velez, A., Méndez, M., 2007. Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques. *Neuropeptides* 41, 421–431.
- Li, X.W., Li, T.K., Froehlich, J.C., 1998. Enhanced sensitivity of the nucleus accumbens proenkephalin system to alcohol in rats selectively bred for alcohol preference. *Brain Res.* 794, 35–47.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1987. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7, 2445–2464.
- Marinelli, P.W., Quirion, R., Gianoulakis, C., 2003. A microdialysis profile of beta-endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Psychopharmacology (Berl)* 169, 60–67.
- Méndez, M., Leriche, M., Calva, J.C., 2001. Acute ethanol administration differentially modulates mu opioid receptors in the rat meso-accumbens and mesocortical pathways. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 94, 148–156.
- Méndez, M., Morales-Mulia, M., 2008. Role of mu and delta opioid receptors in alcohol drinking behaviour. *Curr. Drug Abuse Rev.* 2, 239–252.
- Méndez, M., Morales-Mulia, M., Pérez-Luna, J.M., 2008. Ethanol-induced changes in proenkephalin mRNA expression in the rat nigrostriatal pathway. *J. Mol. Neurosci.* 34, 225–234.
- Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., George, S.R., 1996. Genotypic differences in mesolimbic enkephalin gene expression in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311, 45–52.
- Olive, M.F., Koenig, H.N., Nannini, M.A., Hodge, C.W., 2001. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J. Neurosci.* 21, RC184.
- O'Malley, S.S., Jaffe, A.J., Chang, G., Schottenfeld, R.S., Meyer, R.E., Rounsaville, B., 1992. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch. Gen. Psychiatry* 49, 881–887.
- Patel, V.A., Pohorecky, L.A., 1989. Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. *Alcohol* 6, 59–63.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, San Diego.
- Phillips, T.J., Wenger, C.D., Dorow, J.D., 1997. Naltrexone effects on ethanol drinking acquisition and on established ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21, 691–702.
- Poplawski, M.M., Boydjjeva, N., Sarkar, D.K., 2005. Vasoactive intestinal peptide and corticotropin-releasing hormone increase beta-endorphin release and proopiomelanocortin messenger RNA levels in primary cultures of hypothalamic cells: effects of acute and chronic ethanol treatment. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 648–655.
- Popp, R.L., Erickson, C.K., 1998. The effect of an acute ethanol exposure on the rat brain POMC opiate system. *Alcohol* 16, 139–148.
- Przewlocka, B., Dziedzicka, M., Lason, W., 1990. The effects of ethanol treatment on endogenous opioid peptides level and analgesia in monoarthritic rats. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 42, 343–349.
- Rasmussen, D.D., Bryant, C.A., Boldt, B.M., Colasurdo, E.A., Levin, N., Wilkinson, C.W., 1998. Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 789–801.
- Rees, L.H., Cook, D.M., Kendall, J.W., Allen, C.F., Kramer, R.M., Ratcliffe, J.G., Knight, R.A., 1971. A radioimmunoassay for rat plasma ACTH. *Endocrinology* 89, 254–261.
- Richardson, H.N., Lee, S.Y., O'Dell, L.E., Koob, G.F., Rivier, C.L., 2008. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1641–1653.
- Roberts, A.J., McDonald, J.S., Heyser, C.J., Kieffer, B.L., Matthes, H.W., Koob, G.F., Gold, L.H., 2000. Mu-opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 1002–1008.
- Robinson, D.L., Carelli, R.M., 2008. Distinct subsets of nucleus accumbens neurons encode operant responding for ethanol versus water. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1887–1894.
- Saland, L.C., Abeyta, A., Frausto, S., Raymond-Stintz, M., Hastings, C.M., Carta, M., Valenzuela, C.F., Savage, D.D., 2004. Chronic ethanol consumption reduces delta- and mu-opioid receptor-stimulated G-protein coupling in rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 28, 98–104.
- Schulz, R., Wuster, M., Duka, T., Herz, A., 1980. Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology (Berl)* 68, 221–227.
- Seizinger, B.R., Bovermann, K., Maysinger, D., Holt, V., Herz, A., 1983. Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid peptide systems in discrete regions of rat brain and pituitary. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 (Suppl. 1), 361–369.
- Seizinger, B.R., Bovermann, K., Holt, V., Herz, A., 1984. Enhanced activity of the beta-endorphinergic system in the anterior and neurointermediate lobe of the rat pituitary after chronic treatment with ethanol liquid diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 455–461.
- Shoaib, M., Spanagel, R., Stohr, T., Shippenberg, T.S., 1995. Strain differences in the rewarding and dopamine-releasing effects of morphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 117, 240–247.
- Sim-Selley, L.J., Sharpe, A.L., Vogt, L.J., Brunk, L.K., Selley, D.E., Samson, H.H., 2002. Effect of ethanol self-administration on mu- and delta-opioid receptor-mediated G-protein activity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 688–694.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1990. Identification of the opioid receptor types mediating beta-endorphin-induced alterations in dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 190, 177–184.
- Spanagel, R., Herz, A., Shippenberg, T.S., 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2046–2050.
- Stromberg, M.F., Casale, M., Volpicelli, L., Volpicelli, J.R., O'Brien, C.P., 1998. A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and beta-funaltrexamine on ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 15, 281–289.
- Tempel, A., Zukin, R.S., 1987. Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4308–4312.
- Turchan, J., Przewlocka, B., Toth, G., Lason, W., Borsodi, A., Przewlocki, R., 1999. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience* 91, 971–977.
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., Spanagel, R., 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 299–315.

- Verhoef, J., Wiegant, V.M., De Wied, D., 1982. Regional distribution of alpha- and gamma-type endorphins in rat brain. *Brain Res.* 231, 454–460.
- Vescovi, P.P., Coiro, V., Volpi, R., Giannini, A., Passeri, M., 1992. Plasma beta-endorphin, but not met-enkephalin levels are abnormal in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol.* 27, 471–475.
- Volpicelli, J.R., Alterman, A.I., Hayashida, M., O'Brien, C.P., 1992. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* 49, 876–880.
- Welch, C.C., Kim, E.M., Grace, M.K., Billington, C.J., Levine, A.S., 1996. Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic dynorphin peptide and mRNA levels. *Brain Res.* 721, 126–131.
- Wheeler, R.A., Carelli, R.M., 2009. Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. *Neuropharmacology* 56 (Suppl.), 149–159.
- Zalewska-Kazubska, J., Czarnecka, E., 2005. Deficit in beta-endorphin peptide and tendency to alcohol abuse. *Peptides* 26, 701–705.

Discusión



WWW.PHDCOMICS.COM

El alcohol induce la activación del sistema β -endorfinérgico y a largo plazo, su neuroadaptación (cambios en los niveles del péptido y su precursor así como alteraciones en los receptores a opioides). Se ha propuesto que estos eventos son cruciales en la adquisición y el mantenimiento de la conducta de alto consumo de alcohol (Zalewska-Kaszubska y Czarnecka, 2005). A pesar de que se han llevado a cabo numerosos estudios del tema, los efectos de la droga sobre el sistema β -endorfinérgico y sus receptores en la vía dopaminérgica mesolímbica aun no han sido explorados completamente. Nuestro principal interés fue investigar como el alcohol afecta la transmisión del péptido en la vía de recompensa. Además, nos pareció trascendental esclarecer si el ARNm de POMC se encuentra presente en regiones que forman parte de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica, ya que los péptidos derivados de este ARNm, en particular la β -endorfina, podrían jugar un papel importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol.

Los principales hallazgos obtenidos en el desarrollo de la presente tesis fueron:

1. El ARNm de POMC, precursor de la β -endorfina, se encuentra presente en la CPF, el NAcc y el ATV, además de otras regiones como el núcleo olfatorio anterior, la SN, así como en las cortezas cingular, motora, piriforme, auditoria, rostropleural agranular, visual secundaria y entorrinal.
2. En los experimentos del curso temporal del efecto de la administración de una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg) sobre los niveles de β -endorfina, no se detectó ningún cambio producido por la droga sobre los niveles del péptido en el M ni en el NAcc+S en ningún tiempo estudiado. La misma dosis de alcohol disminuyó el contenido de β -endorfina en el hipotálamo 1h después de la administración, pero no alteró los niveles del péptido en el ATV, NAcc, CPF y SN.
3. El tratamiento crónico con alcohol no alteró el contenido de β -endorfina en ninguna de las regiones estudiadas. En contraste, la administración crónica de sacarosa aumentó selectivamente el contenido del péptido en el NAcc y la SN.
4. El consumo crónico de etanol no alteró la unión de [H^3]-DAMGO al receptor opioide μ en la CPF, el NAcc ni en el ATV.

I. Consideraciones metodológicas.

Administración de una dosis aguda de alcohol.

Para llevar a cabo nuestro estudio del efecto de una dosis aguda de etanol, elegimos administrar la droga mediante una cánula intragástrica, ya que es un método que permite (al igual que la administración intraperitoneal) suministrar al animal con una dosis precisa.

Por otro lado, dado que los péptidos opioides responden al estrés, habituamos a las ratas a la administración i.g. durante 7 días. Medimos los niveles de beta-endorfina en el NAcc+S y el M en ratas sin administración y con administración i.g. de agua y no encontramos diferencias significativas entre ellos. Comprobamos así, que los niveles del péptido no son modificados debido a la administración i.g. después de 7 días de habituación al procedimiento. Por lo tanto, la administración de drogas por medio de una cánula intragástrica puede ser utilizada para estudiar los efectos del alcohol sobre el sistema beta endorfinérgico, el cual es altamente responsivo a eventos estresantes.

Tratamiento crónico con etanol.

Existen diversas técnicas que se han utilizado para investigar el efecto de la exposición crónica al alcohol. Una de las más utilizadas es la de Lieber y DeCarli (1973) en la cual la droga es administrada en dieta líquida y al grupo control se le sustituyen las calorías que aporta el alcohol con carbohidratos. Este método se desarrolló originalmente con el objetivo de estudiar el daño hepático causado por el etanol (Lieber, 1973). A principios de los 70's prevalecía la idea de que el hígado graso (primera etapa de la cirrosis) se debía únicamente a las deficiencias nutricionales que presentan generalmente los alcohólicos y no a causa del etanol por sí mismo (Lieber, 1973). Por ello, Lieber quiso comprobar que el alcohol produce daño hepático independientemente de la desnutrición y diseñó una dieta líquida que permite al mismo tiempo proporcionar los nutrientes necesarios, así como dosis altas de alcohol durante periodos indefinidos. Diversos grupos de investigación se basaron en esta técnica para investigar los efectos crónicos del alcohol sobre el sistema opioide (e. g. Seizinger et

al., 1983). Boyadjieva y colaboradores (2001) también utilizaron una dieta líquida con etanol o sacarosa (como control isocalórico) y además incluyeron otro grupo control que se alimentó ad libitum. Otros autores han utilizado la administración i.p. (e. g. Przelowcka et al., 1990), mientras que otros fuerzan a la rata a consumir alcohol proporcionándole exclusivamente una solución de etanol para beber (e.g. Schulz et al., 1980). Como se describe en los métodos, nosotros utilizamos esta última opción para administrar la droga. Nuestras ratas del grupo experimental (E) bebieron la solución de alcohol (10 % v/v) de manera uniforme y en cantidades relevantes, alcanzando al final del tratamiento un consumo de 68 ± 7.8 ml / día, equivalente a 5.4 g de etanol. Además del grupo control que recibió agua y alimento ad libitum (C), contamos con el grupo de sacarosa (S), que recibió las mismas calorías que el grupo de etanol. Sin embargo, debido a la forma en que el alcohol es metabolizado, una parte de las calorías que éste aporta se disipan en forma de calor (Lieber, 1973). Por esta razón, incluimos también un grupo que recibió alimento y líquido restringido a lo que consumía el grupo experimental (A).

II. Presencia del ARNm de POMC en diversas regiones del sistema DAérgico mesocorticolímbico.

En el SNC existen dos grupos neuronales muy importantes que sintetizan β -endorfina. Los núcleos arcuatos del hipotálamo contienen las concentraciones más altas de ARNm de POMC, seguidos por el núcleo del tracto solitario (Civelli et al., 1982; Bronstein et al., 1992). También se ha demostrado que otras áreas del cerebro contienen bajos niveles de este ARN, tales como la amígdala, el estriado, el hipocampo, la corteza cerebral y el cerebelo (Grauerholz et al., 1998). Dado que diversas áreas del cerebro tales como el NAcc el tálamo, el mesencéfalo y varias regiones corticales contienen diversos productos del procesamiento del POMC (Moldow and Yalow, 1978; Salih et al., 1979; Akil et al., 1984; Khachaturian et al., 1985; Emeson and Eipper, 1986; Mansour et al., 1988), se sugiere que interneuronas de estas áreas también podrían contener el ARNm de POMC. El sistema β -endorfinérgico se ha relacionado fuertemente con las propiedades

reforzadoras del alcohol y sus efectos conductuales (Herz, 1997), por lo que investigamos la presencia del RNAm de este precursor en la CPFm, el NAcc y el ATV, regiones del sistema DAérgico mesocorticolímbico involucradas en los mecanismos de recompensa y las conductas motivadas.

Demostramos que la amplificación de RNAm de POMC por RT-PCR, utilizando las sondas POMC1 y POMC2 resulta en productos del tamaño esperado (94 y 678 pb, respectivamente) lo cual indica que las regiones que estudiamos contienen RNAm de POMC. Descartamos la posibilidad de que estos productos de la PCR provinieran de la amplificación de DNA o cDNA, ya que al omitir la transcriptasa reversa en la reacción de retro-transcripción no se produjo ningún producto de amplificación. También utilizamos células gliales de la línea C-6 como control negativo, ya que en esta línea celular no se ha descrito la presencia de RNAm de POMC. No obtuvimos ningún producto de amplificación a partir del ARN de la línea celular mencionada.

Encontramos que los niveles de RNAm de POMC (tomando al hipotálamo como el 100%) en la CPFm, el NAcc y el ATV corresponden al 21, 27 y 31 % respectivamente. La mayor expresión de RNAm de POMC en el cerebro se presenta en el hipotálamo (Civelli et al., 1982; Grauerholz et al., 1998). Nuestros estudios de hibridación in situ concuerdan con los hallazgos obtenidos a través de RT-PCR. Además, las fotografías de los autoradiogramas muestran que el RNAm de POMC está distribuido de manera aparentemente homogénea en la CPFm, en el NAcc y en la VTA. Las bajas concentraciones de RNAm que observamos en la CPFm, el NAcc y la VTA podrían deberse a una escasa expresión de este RNAm en un gran número de neuronas o a una alta expresión en pocas neuronas. En el caso del hipotálamo la distribución del RNAm no es uniforme ya que la mayor concentración se localiza en los núcleos arcuatos como se ha reportado previamente (Magoul et al., 1984).

A pesar de que se han utilizado técnicas de alta sensibilidad para investigar la presencia del RNAm de POMC en el cerebro, éste no había sido detectado en la CPFm, el NAcc ni el ATV. El ensayo de protección de RNAsas (EPR) se ha empleado en el pasado con este objetivo. Sin embargo, la RT-PCR ha resultado más eficaz para detectar el RNAm de POMC. Civelli y colaboradores (1982) utilizaron la hibridación en solución (con una sensibilidad de 1 pg de RNAm de POMC / μ g de poli-A y una sonda de 144 pb) y

demonstraron la presencia del ARNm de POMC en el hipotálamo y la amígdala, pero no lograron detectarlo en otras regiones como el estriado + mesencéfalo y el cerebelo. Plata-Salamán y colaboradores (2000), utilizando una ribosonda de 320 pb en un ensayo de hibridación en solución, detectaron el ARNm de POMC en el hipotálamo, pero no en la amígdala, el hipocampo, y las cortezas parietal, prefrontal y piriforme. En contraste, Zhou y colaboradores (1996), utilizando una sonda de 538 pb lograron detectar el ARNm en la amígdala. La sensibilidad de los EPRs depende de la longitud de la sonda, lo cual explica parcialmente las diferencias encontradas en previos trabajos. Sin embargo, otros factores tales como la cantidad total de ARN empleado, la utilización de ARN poli-A y diferencias en la disecciones del tejido también podrían contribuir a las diferencias encontradas. Por otra parte, Grauerholz y colaboradores (1998), utilizando la técnica de RT-PCR, demostraron que la corteza cerebral, el estriado, el hipocampo y el cerebelo contienen ARNm de POMC. Además, por medio de RT-PCR competitiva estimaron la concentración relativa de cDNA de POMC. Encontraron que en el cerebelo, el estriado y la corteza la concentración de este cDNA (en atomolas / μg de ARN total) corresponde aproximadamente al 10% o menos de lo encontrado en el hipotálamo. Utilizando RT-PCR semi-cuantitativa nosotros demostramos que la CPFm, el NAcc y el ATV también expresan ARNm de POMC en niveles que van de 21 al 31 % de lo encontrado en el hipotálamo. La concentración de este ARNm podría ser determinada de manera precisa en estudios ulteriores utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Nuestros resultados concuerdan con aquellos publicados en el Atlas de la expresión génica del Sistema Nervioso Central (The Gene Expression Nervous System Atlas Project, Proyecto GENSAT por sus siglas en inglés) <http://www.gensat.org/index.html>. Estos estudios se llevaron a cabo en ratones transgénicos utilizando un gen reportero que expresa la proteína verde fluorescente, bajo el control transcripcional del gen de POMC. Sus resultados indican que la transcripción del gen de POMC se lleva a cabo en diversas regiones del cerebro incluyendo aquellas que nosotros reportamos en el presente estudio.

En las regiones estudiadas, el ARNm de POMC podría dar origen a péptidos activos derivados de la POMC, como se ha reportado en otras áreas. Se ha demostrado que regiones como el NAcc, la amígdala, el hipocampo, el estriado y el cerebro medio contienen varios péptidos derivados de la POMC tales como la ACTH, la α -MSH y la beta-

endorfina (Rossier et al., 1977; Moldow y Yalow, 1978; Dennis et al., 1983; Mansour et al., 1988). Además, células disociadas en cultivo provenientes de la corteza y la amígdala son capaces de liberar beta-endorfina y ACTH (Kapcala, 1988). Las pro-convertasas 1 y 2, las cuales participan en el procesamiento de la POMC se encuentran en las regiones estudiadas y son capaces de producir ACTH, α -MSH, beta-endorfina, etc. Así, existen todos los elementos necesarios para sugerir que el ARNm de POMC en las regiones analizadas puede ser traducido a POMC y ésta, a su vez, ser procesada y dar origen a péptidos biológicamente activos. Por otro lado, se sabe que el procesamiento de la POMC es diferencial dependiendo del tejido donde se encuentre (Emeson y Eipper, 1986; Mizuno y Matsuo, 1994). Por lo tanto, es posible que en la CPFm, el NAcc y el ATV se encuentren productos del procesamiento de la POMC en proporciones distintas de las que se han descrito en el hipotálamo y la pituitaria.

La presencia del ARNm de POMC en las regiones estudiadas podría tener importantes implicaciones funcionales si se comprueba que ahí ocurre la síntesis y liberación de β -endorfina; ya que la subsecuente interacción con sus receptores constituiría un evento crucial en la regulación de la actividad de la vía DAérgica mesocorticolímbica. Como ya se ha mencionado, la activación de esta vía está íntimamente relacionada con la recompensa y las conductas motivadas, tanto por reforzadores naturales como por las drogas de abuso (Wise y Rompre, 1989; Kalivas y Volkow, 2005; Di Chiara e Imperato, 1988; Koob y Bloom, 1988; Di Chiara et al., 1996). Se ha sugerido que la β -endorfina proveniente del hipotálamo podría participar en los mecanismos de reforzamiento positivo y negativo de las drogas de abuso (e.g. etanol), actuando sobre diversas regiones de la vía dopaminérgica. Nuestros resultados indican que podría existir una contribución local de β -endorfina en estas áreas.

En conclusión, demostramos que el ARNm de POMC se encuentra en la CPFm, el NAcc y el ATV en niveles más bajos que los que se encuentran en el hipotálamo. Un aspecto importante que debe ser investigado es la localización precisa de las neuronas que contienen el ARNm de POMC y sus proyecciones, lo cual ayudaría a entender mejor las implicaciones funcionales de los péptidos derivados de la POMC en las regiones estudiadas. También sería interesante estudiar como ocurre el procesamiento de la POMC en las regiones de la vía DAérgica mesocorticolímbica, ya que los péptidos originados

pueden estar involucrados en diferentes funciones biológicas. Asimismo, debe ser aclarado si en estas regiones existen diferentes formas de ARNm de POMC, como se ha observado en otros tejidos.

Cabe mencionar que la demostración de la presencia del ARNm de POMC en la vía de recompensa nos permitió iniciar el estudio del efecto de la exposición aguda y crónica al alcohol sobre este precursor.

III. Efectos del tratamiento agudo con alcohol.

Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre el contenido de β -endorfina en regiones del sistema dopaminérgico y el hipotálamo.

El sistema β -endorfinérgico es alterado en respuesta al alcohol. Los estudios realizados en este campo se han centrado en la pituitaria y el hipotálamo. En contraste, las regiones de la vía de recompensa han recibido poca atención y los resultados obtenidos hasta el momento son escasos o controversiales.

Encontramos que la administración de una dosis aguda de etanol (2.5 g/kg i.g.) no altera el contenido de la β -endorfina en el M ni en el NAcc+S, en ningún punto de nuestro curso temporal de 24 h. Estos resultados concuerdan con Seizinger y colaboradores (1993), quienes demostraron que una dosis de alcohol (2.5 g/kg i.p.) no altera el contenido del péptido en el M de ratas Sprague Dawley una hora después de la administración. Sin embargo, la exposición a una dosis de 3 g/kg de alcohol aumenta la concentración del péptido en esta región (Anwer y Soliman, 1995). Las regiones disecadas para la primera parte del estudio (curso temporal) fueron relativamente grandes e incluían varios núcleos cerebrales por lo cual, existe la posibilidad de que se hayan enmascarado los efectos de la droga y que éstos pudieran circunscribirse a regiones más discretas. Consecuentemente, estudiamos el efecto del alcohol en regiones específicas del mesencéfalo y en el NAcc. Sin embargo, encontramos que el etanol no altera los niveles del péptido en la VTA ni en la SN una hora después de la administración. Alternativamente, el alcohol podría afectar otras regiones del M, en particular la sustancia gris periacueductal, ya que los niveles del péptido en esta área difieren en roedores seleccionados, dependiendo de la preferencia al alcohol

(Jamensky y Gianoulakis, 1999; Gianoulakis et al., 1992). En nuestro estudio, la administración aguda de alcohol no modificó los niveles del péptido en el NAcc ni la CPF. Answer y Soliman (1995) mostraron que una dosis de 3 g/kg de etanol tampoco altera los niveles de β -endorfina en la CPF.

Los estudios del efecto de la exposición aguda al alcohol sobre la β -endorfina hipotalámica son contradictorios. Utilizando ratas Sprague Dawley, se ha reportado que la administración de dosis entre 0.91 y 3 g/kg no alteran los niveles del péptido en el hipotálamo 30 min y 1 h después de la administración (Seizinger et al., 1983; Rasmussen et al., 1998). Sin embargo, en esta misma cepa dosis similares de etanol (2 y 2.5 g/kg) incrementan el contenido hipotalámico del péptido 20 min y 1 h después de la administración (Schulz et al., 1980; Patel and Pohorecky, 1989). En contraste, encontramos que en ratas Wistar la administración de 2.5 g/kg disminuye (26 %) el contenido de beta-endorfina en el hipotálamo una hora después de la exposición a la droga. En esta misma especie dosis más altas (i.e. 5 g/kg) también disminuyen el contenido del péptido 1 h después de la administración (Przewlocka et al., 1990). Así, la respuesta del sistema β -endorfinérgico puede diferir dependiendo de la cepa de roedor y del protocolo experimental, ya que cepas de roedores genéticamente diferentes presentan distinta sensibilidad a las drogas de abuso. El sistema DAérgico mesocorticolímbico de las ratas Sprague Dawley y Wistar responde de manera diferente a la administración de morfina; en el caso de las ratas Wistar se necesitan dosis más altas de la droga para inducir la liberación de DA (Shoaib et al., 1995).

La disminución observada en la β -endorfina hipotalámica en nuestro estudio podría deberse a cambios en el procesamiento post-traducional del POMC. Se ha reportado que la exposición al alcohol (dos semanas) produce un retraso en el procesamiento de la pro-opiomelanocortina en el lóbulo anterior de la pituitaria (Seizinger et al., 1984). Además, la administración de alcohol aumenta la liberación de β -endorfina del hipotálamo (Gianoulakis, 1990), así como de otras regiones del cerebro inervadas por los núcleos arcuatos tales como el NAcc, el mesencéfalo y la amígdala (Olive et al., 2001; Marinelli et al., 2003; Lam et al., 2008, Jarjour et al., 2009), lo cual también podría contribuir a la disminución de la concentración del péptido observada en el hipotálamo.

En conclusión nuestros resultados indican que la disminución del contenido de la β -endorfina hipotalámica, podría participar en los mecanismos tempranos de reforzamiento del alcohol.

IV. Efectos del tratamiento crónico con alcohol.

Efecto de la exposición crónica al etanol sobre el contenido de β -endorfina en regiones del sistema dopaminérgico.

El efecto del alcohol sobre los sistemas de péptidos opioides ha sido estudiado utilizando diversas técnicas para administrar la droga, como dieta líquida, por vía intragástrica, etc. (Seizinger et al., 1983, 1984; Patel y Pohorecky, 1989). Sin embargo, cuando la sacarosa es utilizada para substituir las calorías que aporta el alcohol, generalmente se asume que ésta no produce efectos sobre los sistemas opioidérgicos y rara vez se incluye un grupo control ad libitum (Boyadjieva et al., 2001). Nosotros encontramos que la sacarosa en comparación con los grupos ad libitum, agua y etanol, induce un incremento en los niveles de la β -endorfina en el NAcc y la SN. Estos cambios en la concentración del péptido no se deben a diferencias en el consumo calórico o de fluidos, ya que no hay diferencias (en el contenido de β -endorfina) entre los grupos ad libitum, agua o etanol. El efecto de la sacarosa sobre la concentración del péptido podría deberse a un aumento local en los niveles de su precursor. Actualmente, se están completando en el laboratorio de la Dra. Méndez los estudios del efecto de la exposición crónica al alcohol y a la sacarosa sobre los niveles de ARNm de POMC en diversas regiones del sistema DAérgico. Estos resultados nos brindarán la información necesaria para saber si existe una relación entre los cambios observados en los niveles del péptido y cambios en la expresión del ARNm de POMC.

El alcohol y la sacarosa son ampliamente reconocidos como reforzadores (para revisión Wheeler y Carelli, 2009; Herz, 1997). Sin embargo, el alcohol no indujo cambios en el NAcc ni en la SN, lo cual sugiere que el efecto de la sacarosa se debe a su alta palatabilidad. De acuerdo con esta propuesta, se ha reportado que la comida altamente palatable altera la expresión de las encefalinas y dinorfinas en el estriado y

en los núcleos arcuatos del hipotálamo, respectivamente (Kelley et al., 2003; Welch et al., 1996). Además, nuestros resultados sugieren que la β -endorfina podría participar de manera importante en las propiedades reforzadoras de la sacarosa. De acuerdo con esto, Kelley y colaboradores (2002) demostraron que la palatabilidad es modulada por opioides en el NAcc. Por otro lado, la diferencia entre los efectos del alcohol y la sacarosa era esperada, ya que se ha demostrado que las drogas de abuso (i.e., cocaína y etanol) y los reforzadores naturales (i.e., comida, agua) activan diferencialmente distintas poblaciones neuronales en el NAcc (para revisión, ver Wheeler y Carelli, 2009; Robinson y Carelli, 2008). Así, los mecanismos que conllevan al reforzamiento por drogas de abuso y reforzadores naturales en el NAcc (y posiblemente en otras regiones como la SN) parecen ser distintos; en particular, nosotros demostramos una activación diferencial del sistema endorfinérgico.

En contraste con los efectos observados en el NAcc y la SN, encontramos que la sacarosa no altera el contenido de la β -endorfina en ninguna de las demás regiones estudiadas en comparación con los demás grupos. Este resultado concuerda con Boyadjieva y colaboradores (2001), quienes no encontraron diferencias significativas en el contenido hipotalámico de β -endorfina entre su grupo sacarosa (11.4% en dieta líquida) y el grupo ad libitum después de 1 a 4 semanas de tratamiento.

Estudios clínicos y en animales indican que la exposición crónica al alcohol lleva a la desensibilización neuroendócrina y a deficiencias en el sistema endorfinérgico (e.g. disminución en el contenido del péptido en el hipotálamo y otras regiones del cerebro, desensibilización de las neuronas β -endorfinérgicas al alcohol) (Richardson et al., 2008; Zalewska-Kaszubska y Czarnecka, 2005). Nosotros encontramos que el tratamiento crónico con alcohol, comparado con los grupos ad libitum y de agua restringida no altera la concentración de β -endorfina en ninguna región estudiada. Estos resultados podrían deberse al desarrollo de tolerancia al alcohol del sistema endorfinérgico, como se ha demostrado para otros productos del ARNm de POMC (Richardson et al., 2008). Richardson y colaboradores (2008) reportaron que la inyección de 1 g/kg de etanol aumenta los niveles de ACTH en el plasma de roedores no dependientes, mientras que en los roedores dependientes no se producen cambios.

Acorde con nuestros resultados Schulz y cols. (1980) no encontraron cambios en la β -endorfina hipotalámica después del tratamiento crónico con alcohol. Sin embargo, otros estudios han encontrado que la exposición crónica al alcohol produce aumentos (Patel y Pohorecky, 1989; Boyadjieva et al., 2001) o disminuciones (Boyadjieva et al., 2001) en la concentración del péptido en esta misma región. Es interesante resaltar que la duración del tratamiento puede explicar en parte las variaciones en los resultados previamente publicados. Seis a 10 días de exposición al alcohol, independientemente de la vía de administración, la dosis administrada o la cepa de rata utilizada, llevan a un incremento en los niveles hipotalámicos del péptido (Patel y Pohorecky, 1989; Przewlocka et al., 1990; Boyadjieva et al., 2001). Un tratamiento más prolongado (2-4 semanas) generalmente no afecta el contenido del péptido (Schulz et al., 1980; Seizinger et al., 1983; el presente estudio) o induce una disminución (Boyadjieva et al., 2001). En nuestro caso, podemos decir con certeza que esta aparente ausencia de efecto de la droga es, dicho de manera más precisa, una recuperación, ya que el tratamiento agudo produjo una disminución del 26% de la concentración de la β -endorfina hipotalámica. La inconsistencia de los efectos de la administración crónica de alcohol sobre los niveles de este péptido se debe, en gran medida, a la duración del tratamiento, lo cual sugiere que las alteraciones en el sistema beta endorfinérgico son dinámicas y podrían estar relacionadas con la etapa en el desarrollo de la adicción en que se encuentra el animal al finalizar el estudio. El alcohol, al igual que cualquier otra droga de abuso, induce neuroadaptaciones que se producen dependiendo de numerosos parámetros (e.g. las dosis utilizadas, la frecuencia con la que se usa la droga, el tiempo que ésta ha sido utilizada, etc.). Es posible reconocer al menos 3 periodos distintos dentro del progreso de la adicción: el consumo inicial, el desarrollo de tolerancia y la dependencia. Los efectos del alcohol se pueden expresar de diferente manera a lo largo de estas etapas. Por ejemplo, el eje HPA es activado por la administración aguda de alcohol, el cual induce un aumento en la liberación de corticosterona y ACTH. Sin embargo, la exposición crónica mínima suficiente para producir dependencia inhibe las respuestas neuroendócrinas previamente mencionadas (Richardson et al., 2008). Además, este estudio concluye que la tolerancia del sistema neuroendócrino a la droga puede originarse antes de que la

dependencia se establezca y que se relaciona con la cantidad de alcohol consumido (Richardson et al., 2008). Adicionalmente, otros parámetros tales como la dosis administrada, la cepa utilizada y diferencias en las disecciones podrían contribuir a las variaciones observadas.

Efecto de la exposición crónica al etanol sobre la unión de [H^3]-DAMGO al receptor μ en regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.

El tratamiento crónico con alcohol no alteró la unión de [H^3]-DAMGO al receptor μ en ninguna de las regiones estudiadas (CPF, CPFm cubierta y centro del NAcc y ATV). Turchan y cols. (1999) encontraron que la administración de etanol (1-6 %) durante 30 días produce una disminución en la unión de DAMGO al receptor μ , la cual se mantiene 24, 48 y 96 horas después de la interrupción del consumo de la droga. Estos estudios sugieren que los efectos de la droga sobre este receptor son de larga duración. Las diferencias entre los resultados encontrados por Turchan y colaboradores (1999) y los del presente trabajo podrían deberse a las concentraciones de alcohol utilizadas. La activación de los receptores a opioides, al igual que la del sistema endorfinérgico, son altamente sensibles a la dosis y al tiempo de exposición a la droga (como revisión ver Méndez y Morales-Mulia, 2008). Nuestros resultados sugieren que el alcohol no altera la afinidad y/o la densidad de los receptores μ en las regiones estudiadas. Esto puede investigarse llevando a cabo un análisis de Scatchard. Sin embargo, la exposición crónica al etanol podría disminuir el acoplamiento de las proteínas G a los receptores μ estimulada por agonistas (i.e. DAMGO) en algunas regiones del cerebro, como se ha reportado para la CPF, el NAcc, la parte lateral del septum, el estriado y algunas áreas específicas del giro dentado y el colículo superior e inferior (Chen y Lawrence, 2000; Sim-Selley et al., 2002; Saland et al., 2004). Esta disminución en el acoplamiento podría deberse a la internalización de los receptores μ , se ha reportado una disminución en el número de sitios en la corteza frontal después de la exposición crónica al alcohol (Khatami et al., 1987). La fosforilación de los receptores μ también podría alterar el acoplamiento con las proteínas G (Narita et al., 2001). Así, alteraciones en el acoplamiento de las proteínas G a los receptores a

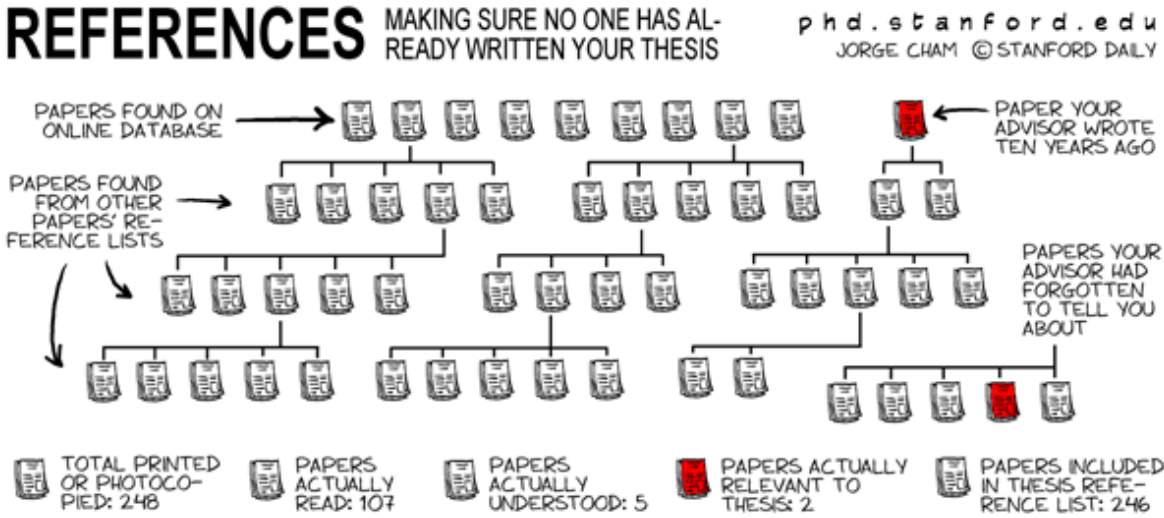
opioides μ y las consecuencias funcionales que esto conlleva (i.e. interferencia en la transducción de señales) podrían contribuir en el mantenimiento de la conducta de consumo de alcohol. Se requieren más estudios para conocer el papel preciso que juega el receptor opioide μ en los mecanismos de adicción al alcohol.

En conclusión, los efectos crónicos del alcohol sobre el sistema endorfinérgico no se expresan como cambios en el contenido de β -endorfina o en la unión de [H^3]-DAMGO al receptor μ en regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. En contraste, incrementos en la concentración de β -endorfina en el NAcc y la SN podrían participar en los mecanismos de reforzamiento de los reforzadores naturales (i.e. sacarosa). Así, las drogas de abuso y los reforzadores naturales parecen ejercer sus acciones a través de mecanismos diferentes.

Conclusión general.

La administración aguda de etanol produjo una disminución en la concentración de β -endorfina en el hipotálamo así como, la activación neuronal en regiones corticales y subcorticales específicas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Estos cambios podrían ser importantes en los mecanismos de reforzamiento del alcohol en la etapa inicial de la adicción. Después de un mes de exposición a la droga el contenido hipotalámico de beta-endorfina regresó a los niveles normales, lo cual podría indicar el desarrollo de tolerancia al alcohol. El tratamiento crónico con etanol no produjo cambios en los niveles del péptido ni en la unión de [H^3]-DAMGO al receptor μ en ninguna región estudiada. Así, mientras la administración de una dosis aguda de etanol induce cambios en la concentración de la beta-endorfina hipotalámica y en la unión de [H^3]-DAMGO al receptor μ en diversas regiones del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Méndez et al., 2001), el consumo crónico produce cambios neuroadaptativos que impiden la expresión de estas respuestas iniciales. Sería interesante investigar en qué momento cambia la respuesta del sistema beta-endorfinérgico al alcohol y si esto se relaciona con la expresión de la dependencia.

Bibliografía



- ♣ Adler B., Goodman R.R., Pasternak G.W. In handbook of chemical neuroanatomy, Ed. A. Björklund, T. Hökfelt, and M. J. Kuhar, Elsevier, Amsterdam, Vol 9. 1990: 359-93.
- ♣ Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M.E, Khachaturian H., Walker J.M. Endogenous opioids: Biology and function, *Ann. Rev. Neurosc.* 7. 1984: 223-55.
- ♣ Angelogianni P, Gianoulakis C. Chronic ethanol increases proopiomelanocortin gene expression in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 1993 Jan;57(1):106-14.
- ♣ Anton RF, Oroszi G, O'Malley S, Couper D, Swift R, Pettinati H, Goldman D. An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the Combined Pharmacotherapies and Behavioral Interventions for Alcohol Dependence (COMBINE) study. *Arch Gen Psychiatry.* 2008 Feb;65(2):135-44.
- ♣ Anwer, J., Soliman, M.R., Ethanol-induced alterations in beta-endorphin levels in specific rat brain regions: modulation by adenosine agonist and antagonist. *Pharmacology* 1995 51, 364-369.
- ♣ Appleyard S.M., Patterson T.A., Jin W., Chavkin C. Agonist-induced phosphorylation of the kappa-opioid receptor. *J Neurochem.* 1997 Dec; 69(6): 2405-12.
- ♣ Arden J.R., Segredo V., Wang Z., Lameh J., Sadee W. Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem.* 1995 Oct; 65(4): 1636-45.
- ♣ Attali B, Gouardères C, Mazarguil H, Audigier Y, Cros J. Evidence for multiple "Kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides.* 1982 Oct;3(1):53-64.
- ♣ Atweh S.F., Kuhar M.J. Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain. *Br Med Bull.* 1983 Jan;39(1): 47-52.
- ♣ Bain G. T., Kornetsky C. Ethanol oral self-administration and rewarding brain stimulation. *Alcohol*, 6. 1989: 499-503.
- ♣ Barson JR, Carr AJ, Soun JE, Sobhani NC, Leibowitz SF, Hoebel BG. Opioids in the nucleus accumbens stimulate ethanol intake. *Physiol Behav.* 2009 Oct 19;98(4):453-9. Epub 2009 Aug 6.
- ♣ Befort K., Mattei M.G., Roeckel N., Kieffer B. 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.
- ♣ Belknap J.K., Crabbe J.C., Young E.R. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains, *Psychopharmacology* 112. 1993: 503-510.
- ♣ Belluzzi J.D., Stein L. Enkephaline may mediate euphoria and drive-reduction reward. *Nature.* 1977 Apr 7; 266(5602): 556-8.
- ♣ Berman R.F., Lee J.A., Olson K.L., Goldman M.S. Effects of naloxone on ethanol dependence in rats. *Drug Alcohol Depend.* 1984 May; 13(3): 245-54.
- ♣ Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Guillemin R. Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Mar; 75(3): 1591-5.
- ♣ Blum K., Briggs A.H. Opioid peptides and genotypic responses to ethanol, *Biogenic Amines* 5. 1988: 527-533.
- ♣ Blum K, Briggs AH, Trachtenberg MC, Delallo L, Wallace JE. Enkephalinase inhibition: regulation of ethanol intake in genetically predisposed mice. *Alcohol.* 1987 Nov-Dec;4(6):449-56.
- ♣ Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, Gong J, Schluger J, Strong JA, Leal SM, Tischfield JA, Kreek MJ, Yu L. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9608-13.
- ♣ Boom A, Mollereau C, Meunier JC, Vassart G, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN. Distribution of the nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. *Neuroscience.* 1999;91(3):991-1007.
- ♣ Borsodi A., Toth G. Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 May 10; 757: 339-52.
- ♣ Boyadjieva, N., Dokur, M., Advis, J.P., Meadows, G.G., Sarkar, D.K., Chronic ethanol inhibits NK cell cytolytic activity: role of opioid peptide beta-endorphin. *J Immunol* 2001. 167, 5645-5652.
- ♣ Bozarth, M.A. Ventral tegmental reward system. In L. Orelund and J. Engel (eds.), *Brain Reward Systems and Abuse* (pp. 1-17). New York: Raven Press. 1987

- ♣ Brodie M.S., Shefner S.A., Dunwiddie T.V. Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro, *Brain Res.* 508. 1990: 65-69.
- ♣ Bronstein, D.M., Schafer, M.K., Watson, S.J., Akil, H., Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res.* 1992. 587, 269-275.
- ♣ Burbach JP, De Kloet ER, Schotman P, De Wied D. Proteolytic conversion of beta-endorphin by brain synaptic membranes. Characterization of generated beta-endorphin fragments and proposed metabolic pathway. *J Biol Chem.* 1981 Dec 10;256(23):12463-9.
- ♣ Burov IuV, Absava GI, Kampov-Polevoi AB, Kliuev SM. [Ethanol elimination in rats with different levels of alcoholic motivation] *Farmakol Toksikol.* 1981 Jan-Feb;44(1):50-2.
- ♣ Carroll MR, Rodd ZA, Murphy JM, Simon JR. Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats. *Alcohol.* 2006 Oct;40(2):103-9.
- ♣ Chang GQ, Barson JR, Karatayev O, Chang SY, Chen YW, Leibowitz SF. Effect of chronic ethanol on enkephalin in the hypothalamus and extra-hypothalamic areas. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010 May;34(5):761-70.
- ♣ Chang GQ, Karatayev O, Ahsan R, Avena NM, Lee C, Lewis MJ, Hoebel BG, Leibowitz SF. Effect of ethanol on hypothalamic opioid peptides, enkephalin, and dynorphin: relationship with circulating triglycerides. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007 Feb;31(2):249-59.
- ♣ Chang K.-J., Cooper B.R., Hazum E., Cuatrecasas P. Multiple opiate receptors: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides, *Mol. Pharmacol.* 16. 1979: 91-104.
- ♣ Chang K.-J., Cuatrecasas P. Heterogeneity and properties of opiate receptors. *Fed Proc.* 40. 1981: 2729-2734.
- ♣ Chen CL, Mather JP, Morris PL, Bardin CW. Expression of pro-opiomelanocortin-like gene in the testis and epididymis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Sep;81(18):5672-5.
- ♣ Chen F, Lawrence AJ. Effect of chronic ethanol and withdrawal on the mu-opioid receptor- and 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor-stimulated binding of [(35)S]Guanosine-5'-O-(3-thio)triphosphate in the fawn-hooded rat brain: A quantitative autoradiography study. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Apr;293(1):159-65.
- ♣ Cherubini E., North R.A. Mu and kappa opioids inhibit transmitter release by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Mar; 82(6): 1860-3.
- ♣ Chiou LC, Fan SH, Chuang KC, Liao YY, Lee SZ. Pharmacological characterization of nociceptin/orphanin FQ receptors, a novel opioid receptor family, in the midbrain periaqueductal gray. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Oct;1025:398-403.
- ♣ Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinssen EP. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets.* 2007 Jan;8(1):117-35.
- ♣ Chrétien M, Seidah NG. Chemistry and biosynthesis of pro-opiomelanocortin. ACTH, MSH's, endorphins and their related peptides. *Mol Cell Biochem.* 1981 Jan 28;34(2):101-27
- ♣ Civelli O., Birnberg N., Herbert E. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem.* 1982 Jun 25; 257(12): 6783-7.
- ♣ Cloninger CR, Bohman M, Sigvardsson S, von Knorring AL. Psychopathology in adopted-out children of alcoholics. The Stockholm Adoption Study. *Recent Dev Alcohol.* 1985;3:37-51.
- ♣ Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature.* 1982 Feb 25;295(5851):663-6.
- ♣ Crabbe JC, Kosobud A. Sensitivity and tolerance to ethanol in mice bred to be genetically prone or resistant to ethanol withdrawal seizures. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Nov;239(2):327-33.
- ♣ Crabbe JC, Young ER, Deutsch CM, Tam BR, Kosobud A. Mice genetically selected for differences in open-field activity after ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1987 Jul;27(3):577-81.
- ♣ Davidson, D., Amit, Z., Naltrexone blocks acquisition of voluntary ethanol intake in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1997. 21, 677-683.

- ♣ de la Baume S, Yi CC, Schwartz JC, Chaillet P, Marcais-Collado H, Costentin J. Participation of both 'enkephalinase' and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neuroscience*. 1983 Jan;8(1):143-51.
- ♣ de Waele J.-P., Gianoulakis C. 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.
- ♣ de Waele J.-P., Gianoulakis C. 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.
- ♣ de Waele JP, Kiiianmaa K, Gianoulakis C. Spontaneous and ethanol-stimulated in vitro release of beta-endorphin by the hypothalamus of AA and ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994 Dec;18(6):1468-73.
- ♣ de Waele J.-P., Kiiianmaa K., Gianoulakis C. 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.
- ♣ de Waele J.-P., Papachristou D.N., Gianoulakis C. 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.
- ♣ Deby-Dupont, G., Reuter, A.M., Joris, J., Vrindts-Gevaert, Y., Franchimont, P., [Labeling of beta-endorphin and beta-lipotropin with iodine 125]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1983. 177, 259-268.
- ♣ Dennis, M., Seidah, N.G., Chretien, M., Regional heterogeneity in the processing of pro-opiomelanocortin in rat brain. 1983. *Life Sci.* 33, 49-52.
- ♣ Devine D.P., Wise R.A. Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci.* 1994 Apr; 14(4): 1978-84
- ♣ Di Chiara, G., Acquas, E., Tanda, G., Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: the dopamine-opioid link. *Alcohol* 1996. 13,13-17.
- ♣ Di Chiara G., Imperato A. Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats, *Eur. J. Pharmacol.* 115. 1985: 131-132.
- ♣ Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5274-8.
- ♣ Dilts R.P., Kalivas P.W. Autoradiographic localization of mu-opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Res.* 1989 May 29; 488(1-2): 311-27.
- ♣ Duggan A.W. Detection of neuropeptide release in the central nervous system with antibody microprobes. *J Neurosci Methods.* 1990 Sep; 34(1-3): 47-52.
- ♣ El Kouhen R, Kouhen OM, Law PY, Loh HH. The absence of a direct correlation between the loss of [D-Ala², MePhe⁴, Gly⁵-ol]Enkephalin inhibition of adenylyl cyclase activity and agonist-induced mu-opioid receptor phosphorylation. *J Biol Chem.* 1999 Apr 2;274(14):9207-15.
- ♣ Emeson, R.B., Eipper, B.A., Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus. *J. Neurosci.* 1986. 6, 837-849.
- ♣ Eriksson K. Ethyl alcohol consumption: valid measurement in albino rats. *Science.* 1968 Jul 5; 161(836): 76-7.
- ♣ Fadda F., Mosca E., Colombo G., Gessa G.L. Alcohol-preferring rats: genetic sensitivity to alcohol-induced stimulation of dopamine metabolism. *Physiol Behav.* 1990 Apr; 47(4): 727-9.
- ♣ Fadda P., Tronci S., Colombo G., Fratta W. Differences in the opioid system in selected brain regions of alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Aug; 23(8): 1296-305.
- ♣ Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev.* 2007 Mar;59(1):88-123.
- ♣ Froehlich J.C., Harts J., Lumeng L., Li T.-K. Naloxone attenuates ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference, *Physiol. Biochem. Behav.* 35. 1990: 385-390.
- ♣ Froehlich J.C., Zweifel M., Harts J., Lumeng L., Li T.-K. Importance of delta opioid receptors in maintaining high alcohol drinking, *Psychopharmacology* 103. 1991: 467-472.

- ♣ Garzón M., Pickel V.M. Plasmalemmal mu-opioid receptor distribution mainly in nondopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area, *Synapse*. 2001 Sep 15; 41(4): 311-28.
- ♣ Gatto G.J., McBride W.J., Murphy J.M., Lumeng L., Li T.K. Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol*. 1994 Nov-Dec; 11(6): 557-64.
- ♣ Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res*. 1985 Nov 25;348(1):201-3.
- ♣ Gianoulakis C. The effect of ethanol on the biosynthesis and regulation of opioid peptides. *Experientia*. 1989 May 15;45(5):428-35.
- ♣ Gianoulakis C. 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.
- ♣ Gianoulakis C. Endogenous opioids and excessive alcohol consumption, *J Psychiatry Neurosci*, 18. 1993: 148-156.
- ♣ Gianoulakis C. Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci*. 2001 Sep; 26(4): 304-18.
- ♣ Gianoulakis C. Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse. *Curr Top Med Chem*. 2004;4(1):39-50. Review.
- ♣ Gianoulakis C, Béliveau D, Angelogianni P, Meaney M, Thavundayil J, Tawar V, Dumas M. Different pituitary beta-endorphin and adrenal cortisol response to ethanol in individuals with high and low risk for future development of alcoholism. *Life Sci*. 1989;45(12):1097-109.
- ♣ Gianoulakis C., de Waele J.P., Kiianmaa K. 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.
- ♣ Gianoulakis C, Gupta A. Inbred strains of mice with variable sensitivity to ethanol exhibit differences in the content and processing of beta-endorphin. *Life Sci*. 1986 Dec 15;39(24):2315-25.
- ♣ Gilman A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56: 615-49. Review.
- ♣ Goldstein A., Fischli W., Lowney L., Hunkapiller M., Hood L. Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78. 1981: 7219-23.
- ♣ Gong J., Li X.-W., Lai Z., Froehlich J.C., Yu L., 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.
- ♣ Grauerholz, B.L., Jacobson, J.D., Handler, M.S., Millington, W.R., Detection of pro-opiomelanocortin mRNA in human and rat caudal medulla by RT-PCR. *Peptides* 1998. 19, 939-948.
- ♣ Grisel JE, Mogil JS, Grahame NJ, Rubinstein M, Belknap JK, Crabbe JC, Low MJ. Ethanol oral self-administration is increased in mutant mice with decreased beta-endorphin expression. *Brain Res*. 1999 Jul 17;835(1):62-7.
- ♣ Guitart-Masip M, Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Cañete T, Tobeña A, Ogren SO, Terenius L, Johansson B. Reduced ethanol response in the alcohol-preferring RHA rats and neuropeptide mRNAs in relevant structures. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan;23(2):531-40.
- ♣ Gustafsson L, Zhou Q, Nylander I. Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male Wistar rats are dependent on early environmental factors. *Neuroscience*. 2007 May 25;146(3):1137-49.
- ♣ Harlan RE, Shivers BD, Romano GJ, Howells RD, Pfaff DW. Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol*. 1987 Apr 8;258(2):159-84.
- ♣ Herz A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction, *Psychopharmacology* 12. 1997: 99-111.
- ♣ Herz A., Shippenberg T.S., Bals-Kubik R., Spanagel R. Opiate addiction. Pharmacologic and biochemical aspects. *Arzneimittelforschung*. 1992 Feb; 42(2A): 256-9
- ♣ Hescheler J., Kameyama M., Trautwein W., Mieskes G., Soling H.D. Regulation of the cardiac calcium channel by protein phosphatases. *Eur J Biochem*. 1987 Jun 1;165(2):261-6.

- ♣ Hjelmstad G.O., Fields H.L. Kappa opioid receptor inhibition of glutamatergic transmission in the nucleus accumbens shell. *J Neurophysiol.* 2001 Mar; 85(3): 1153-8.
- ♣ Hokfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron.* 1991 Dec; 7(6): 867-79.
- ♣ Ho AK, Chen RC. Interactions of narcotics, narcotic antagonists, and ethanol during acute, chronic, and withdrawal states. *Ann N Y Acad Sci.* 1976;281:297-310.
- ♣ Honkanen A, Vilamo L, Wegelius K, Sarviharju M, Hyytiä P, Korpi ER. Alcohol drinking is reduced by a mu 1- but not by a delta-opioid receptor antagonist in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol.* 1996 May 23;304(1-3):7-13.
- ♣ Huges J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine, *Brain Res.* 88. 1975: 295-308.
- ♣ Huges J., Kosterlitz H.W., Morgan B.A., Fothergill L.H., Morris H. Identification of two related pentapeptides from the bobine brain with potent opiate agonist activity, *Nature* 255. 1975: 577.
- ♣ Hyytiä P. Involvement of mu-opioid receptors in alcohol drinking by alcohol-preferring AA rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45. 1993: 697-701.
- ♣ Ikemoto S, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK. 6-OHDA-lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not the maintenance of ethanol consumption in the alcohol-preferring P line of rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Sep;21(6):1042-6.
- ♣ Imperato, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239. 1986: 219-228.
- ♣ Iukhananov Rlu, Maïskii Al, Burov luV. [Effect of one-time and chronic administration of ethanol on the concentration of beta-endorphin in the brain of rats with different alcoholic motivation] *Biull Eksp Biol Med.* 1983 Jul;96(7):43-6.
- ♣ Jamensky NT, Gianoulakis C. Content of dynorphins and kappa-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Nov;21(8):1455-64.
- ♣ Jamensky, N.T., Gianoulakis, C. Comparison of the proopiomelanocortin and proenkephalin opioid peptide systems in brain regions of the alcohol-preferring C57BL/6 and alcohol-avoiding DBA/2 mice. *Alcohol* 1999.18, 177-87.
- ♣ Jarjour S, Bai L, Gianoulakis C. Effect of acute ethanol administration on the release of opioid peptides from the midbrain including the ventral tegmental area. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009 Jun;33(6):1033-43.
- ♣ Jenks BG. Regulation of proopiomelanocortin gene expression: an overview of the signaling cascades, transcription factors, and responsive elements involved. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Apr;1163:17-30.
- ♣ Johnson S.W., North R.A. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol.* 1992a May; 450: 455-68.
- ♣ Johnson S.W., North R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons, *J. Neurosci.* 12. 1992b: 483-488.
- ♣ June HL, Grey C, Warren-Reese C, Durr LF, Ricks-Cord A, Johnson A, McCane S, Williams LS, Mason D, Cummings R, Lawrence A. The opioid receptor antagonist nalmefene reduces responding maintained by ethanol presentation: preclinical studies in ethanol-preferring and outbred Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 Dec;22(9):2174-85.
- ♣ Kalivas, P.W., Volkow, N.D., The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 2005. 162, 1403-1413.
- ♣ Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. *Principles of Neural Science*, 3er. Edición, Ed. Appleton y Lance. 1991 USA.
- ♣ Kapcala, L.P., Stimulated release of immunoreactive adrenocorticotropin and beta-endorphin from extrahypothalamic brain. *Neuroendocrinology* 1988. 47, 50-54.
- ♣ Keith L.D., Crabbe J.C., Robertson L.M., Kendall J.W. Ethanol-stimulated endorphin and corticotropin secretion in vitro, *Brain Res.* 1986 Mar 5; 367(1-2): 222-9.
- ♣ Kelley, A.E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J., Zhang, M., Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol Behav* 2002.76, 365-377.
- ♣ Kelley, A.E., Will, M.J., Steininger, T.L., Zhang, M., Haber, S.N., Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure(R)) alters striatal enkephalin gene expression. *Eur J Neurosci.* 2003.18, 2592-8.

- ♣ Kerdelhue, B., Karteszi, M., Pasqualini, C., Reinberg, A., Mezey, E., Palkovits, M., Circadian variations in beta-endorphin concentrations in pituitary and in some brain nuclei of the adult male rat. *Brain Res* 1983;261, 243-248.
- ♣ Khachaturian, H., Lewis, M.E., Schäfer M.K-H., Watson, S.J., Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends Neurosci.* 1985. 8, 111-119.
- ♣ Khatami S., Hoffman P.L., Shibuya T., Salafsky B. Selective effects of ethanol on opiate receptor subtypes in brain, *Neuropharmacology* 26. 1987: 1503-1507.
- ♣ Kieffer B.L. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol.* 1995 Dec; 15(6): 615-35. Review.
- ♣ Klitenick M.A., DeWitte P., Kalivas P.W. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci.* 1992 Jul; 12(7): 2623-32.
- ♣ Koistinen M, Tuomainen P, Hyytiä P, Kiianmaa K. Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001 Nov;25(11):1605-12.
- ♣ Koob G.F. Neural mechanisms of drug reinforcement, *Ann. NY Acad. Sci.* 654. 1992: 171-191.
- ♣ Koob, G.F., Bloom, F.E., Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 1988. 242, 715-723.
- ♣ Kosobud A, Crabbe JC. Ethanol withdrawal in mice bred to be genetically prone or resistant to ethanol withdrawal seizures. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Jul;238(1):170-7.
- ♣ Krishnan-Sarin S., Jing S.L., Kurtz D.L., Zweifel M., Portoghese P.S., Li T.-K., Froehlich J.C. 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.
- ♣ Lam, M.P., Marinelli, P.W., Bai, L., Gianoulakis, C., Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* 2008. 201, 261-271.
- ♣ Law P.Y., Erickson L.J., El-Kouhen R., Dicker L., Solberg J., Wang W., Miller E., Burd A.L., Loh H.H. Receptor density and recycling affect the rate of agonist-induced desensitization of mu-opioid receptor. *Mol Pharmacol.* 2000 Aug; 58(2): 388-98.
- ♣ Lê AD, Poulos CX, Quan B, Chow S. 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.* 1993 Dec 10;630(1-2):330-2.
- ♣ Lefkowitz R.J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 1998 Jul 24; 273(30): 18677-80.
- ♣ Leriche M and Méndez M. Ethanol exposure selectively alters β -endorphin content but not [3H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain. *Neuropeptides* 2010 44: 9-16.
- ♣ Leriche M, Cote-Vélez A, Méndez M. Presence of pro-opiomelanocortin mRNA in the rat medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and ventral tegmental area: Studies by RT-PCR and in situ hybridization techniques. *Neuropeptides* 2007 41: 421-31.
- ♣ Leriche M, Méndez M, Zimmer L, and Bérod A. Acute Ethanol Induces Fos in GABAergic and non-GABAergic Forebrain Neurons: a Double-Labeling Study in the Medial Prefrontal Cortex and Extended Amygdala. *Neuroscience* 2008 153: 259-267.
- ♣ Lewis ME, Sherman TG, Burke S, Akil H, Davis LG, Arentzen R, Watson SJ. Detection of proopiomelanocortin mRNA by in situ hybridization with an oligonucleotide probe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Aug;83(15):5419-23.
- ♣ Lewis M.J., June H.J. Neurobehavioral studies of ethanol reward and activation. *Alcohol*, 7. 1990: 213-219.
- ♣ Li C.H., Chung D. Isolation and structures of a untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands, *Procc Natl Acad Sci USA*, 73. 1976: 1145-48.
- ♣ Li X.W., Li T.K., Froehlich J.C. Enhanced sensitivity of the nucleus accumbens proenkephalin system to alcohol in rats selectively bred for alcohol preference. *Brain Res.* 1998 May 25; 794(1): 35-47.
- ♣ Lieber CS. Alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr.* 1973 Nov;26(11):1163-5.
- ♣ Lieber CS, DeCarli LM. The significance and characterization of hepatic microsomal ethanol oxidation in the liver. *Drug Metab Dispos.* 1973 Jan-Feb;1(1):428-40.

- ♣ Lin J.Y., Pan J.T. Effects of endogenous opioide 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.
- ♣ Lindblom J, Haitina T, Fredriksson R, Schiöth HB. Differential regulation of nuclear receptors, neuropeptides and peptide hormones in the hypothalamus and pituitary of food restricted rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005 Jan 5;133(1):37-46.
- ♣ Lindholm S, Ploj K, Franck J, Nylander I. Repeated ethanol administration induces short- and long-term changes in enkephalin and dynorphin tissue concentrations in rat brain. *Alcohol.* 2000 Nov;22(3):165-71.
- ♣ Lohse M.J., Benovic J.L., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science.* 1990 Jun 22; 248(4962): 1547-50.
- ♣ Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature.* 1977 Jun 9;267(5611):495-9.
- ♣ Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951. 193, 265-275.
- ♣ Lumeng L., Li T.K. The development of metabolic tolerance in the alcohol-preferring P rats: comparison of forced and free-choice drinking of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986 Nov; 25(5): 1013-20.
- ♣ Magoul, R., Dubourg, P., Kah, O., Tramu, G., 1994. Ultrastructural evidence for synaptic inputs of enkephalinergic nerve terminals to target neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 15, 883-892.
- ♣ Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 1988 Jul;11(7):308-14.
- ♣ Marinelli PW, Bai L, Quirion R, Gianoulakis C. A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Oct;29(10):1821-8.
- ♣ Marinelli PW, Kiiianmaa K, Gianoulakis C. Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci.* 2000 Apr 7;66(20):1915-27.
- ♣ Marinelli PW, Lam M, Bai L, Quirion R, Gianoulakis C. A microdialysis profile of dynorphin A(1-8) release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Jun;30(6):982-90.
- ♣ Marinelli P.W., Quirion R., Gianoulakis C. A microdialysis profile of beta-endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Psychopharmacology (Berl).* 2003 Aug; 169(1): 60-7. Epub. 2003 May 21.
- ♣ Marinelli PW, Quirion R, Gianoulakis C. An in vivo profile of beta-endorphin release in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol. *Neuroscience.* 2004;127(3):777-84.
- ♣ Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976 Jun;197(3):517-32.
- ♣ McBride W.J., Chernet E., McKinzie D.L., Lumeng L., Li T.-K. Quantitative autoradiography of mu-opioid receptor in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats, *Alcohol* 16. 1998: 317-323.
- ♣ Méndez M, Barbosa-Luna IG, Pérez-Luna JM, Cupo A, Oikawa J. Effects of acute ethanol administration on methionine-enkephalin expression and release in regions of the rat brain. *Neuropeptides.* 2010 Oct;44(5):413-20. Epub 2010 Jun 1.
- ♣ Méndez M., Leriche M., Calva J.C. Acute ethanol administration differentially modulates mu opioid receptors in the rat meso-accumbens and mesocortical pathways. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Oct 19; 94(1-2): 148-56.
- ♣ Mendez M, Leriche M, Carlos Calva J. Acute ethanol administration transiently decreases [3H]-DAMGO binding to mu opioid receptors in the rat substantia nigra pars reticulata but not in the caudate-putamen. *Neurosci Res.* 2003 Oct;47(2):153-60.
- ♣ Méndez M, Morales-Mulia M. Ethanol exposure differentially alters pro-enkephalin mRNA expression in regions of the mesocorticolimbic system. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Nov;189(1):117-24. Epub 2006 Sep 19.

- ♣ Méndez M, Morales-Mulia M. Role of mu and delta opioid receptors in alcohol drinking behaviour. *Curr Drug Abuse Rev.* 2008 Jun;1(2):239-52.
- ♣ Méndez M, Morales-Mulia M, Leriche M. [3H]DPDPE binding to delta opioid receptors in the rat mesocorticolimbic and nigrostriatal pathways is transiently increased by acute ethanol administration. *Brain Res.* 2004 Dec 3;1028(2):180-90.
- ♣ Méndez M, Morales-Mulia M, Pérez-Luna JM. Ethanol-induced changes in proenkephalin mRNA expression in the rat nigrostriatal pathway. *J Mol Neurosci.* 2008 Mar;34(3):225-34. Epub 2008 Jan 29.
- ♣ Millington WR, Rosenthal DW, Unal CB, Nyquist-Battie C. Localization of pro-opiomelanocortin mRNA transcripts and peptide immunoreactivity in rat heart. *Cardiovasc Res.* 1999 Jul;43(1):107-16.
- ♣ Millington Nutrition & Metabolism 2007 4:18 doi:10.1186/1743-7075-4-18
- ♣ Milner PM. Brain-stimulation reward: a review. *Can J Psychol.* 1991 Mar;45(1):1-36.
- ♣ Minami M., Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res.* 1995 Sep; 23(2): 121-45.
- ♣ Moolten M., Kornetsky C. Oral self-administration of ethanol and not experimenter-administered ethanol facilitates re-warding electrical brain stimulation. *Alcohol, 7.* 1990: 221-225.
- ♣ Mizuno, K., Matsuo, H., 1994. Processing of peptide hormone precursors. In: Imura, H. (Ed.), *The pituitary gland.* Raven Press, New York, pp. 153-178.
- ♣ Moldow, R., Yalow, R.S., 1978. Extrahypophysial distribution of corticotropin as a function of brain size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 994-998.
- ♣ Morris BJ, Haarmann I, Kempter B, Höllt V, Herz A. Localization of prodynorphin messenger rna in rat brain by in situ hybridization using a synthetic oligonucleotide probe. *Neurosci Lett.* 1986 Aug 15;69(1):104-8.
- ♣ Mucha R.F., Herz A. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; 86(3): 274-80.
- ♣ Myers R.D., Borg S., Mossberg R. Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey, *Alcohol* 3. 1986: 383-388.
- ♣ Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature.* 1979 Mar 29;278(5703):423-7.
- ♣ Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF. Involvement of spinal protein kinase Cgamma in the attenuation of opioid mu-receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala2,N-MePhe4,Gly-OI(5)]enkephalin. *J Neurosci.* 2001 Jun 1;21(11):3715-20.
- ♣ Ng GY, O'Dowd BF, George SR. Genotypic differences in mesolimbic enkephalin gene expression in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. *Eur J Pharmacol.* 1996 Sep 5;311(1):45-52.
- ♣ Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 1999 Apr 19;406(4):503-47.
- ♣ Nicolas P. Secondary processing of neurohormones: intracellular proteolytic cleavage of beta-endorphin generates new active neuropeptides. *Biochimie.* 1988 Feb;70(2):177-82.
- ♣ North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(15):5487-91.
- ♣ Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8677-82.
- ♣ Nylander I., Hyytiä P., Forsander O., Terenius L. Differences between Alcohol-Preferring (AA) and Alcohol-Avoiding (ANA) rats in the Prodynorphin and Proenkephalin Systems. *Alcohol Clin Exp Res,* 18. 1994: 1272-1279.
- ♣ Olds J. Hypothalamic substrates of reward. *Physiol Rev.* 1962 Oct;42:554-604.
- ♣ Olds J., Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol,* 47. 1954: 419-427.

- ♣ Olive M.F., Koenig H.N., Nannini M.A., Hodge C.W. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine, *J Neurosci.* 2001 Dec 1; 21(23): RC184.
- ♣ O'Malley S.S. Opioid antagonists in treatment of alcohol dependence: clinical efficacy and prevention of relapse. *Alcohol Alcohol.* 1996; 31(Suppl 1): 77-81.
- ♣ Pasantés H., Sanchez J., Tapia R. *Neurobiología Celular*, Primera edición 1991: 189-90.
- ♣ Pasternak W., Gintzler A.R., Houghten R.A., *Life Sci.* 33 suppl.1. 1983: 167-73.
- ♣ Patel, V.A., Pohorecky, L.A., Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. 1989. *Alcohol* 6, 59-63.
- ♣ Paxinos, G., Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Forth edition. Academic Press, San Diego. 1998.
- ♣ Pei G., Kieffer B.L., Lefkowitz R.J., Freedman N.J. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol.* 1995 Aug; 48(2): 173-7.
- ♣ Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology.* 1998 Nov;68(5):345-54.
- ♣ Perlikowska R, Fichna J, Janecka A. [Endomorphins0endogenous ligands of the mu-opioid receptor] *Postepy Biochem.* 2009;55(4):388-94.
- ♣ Petry NM. Ro 15-4513 selectively attenuates ethanol, but not sucrose, reinforced responding in a concurrent access procedure; comparison to other drugs. *Psychopharmacology (Berl).* 1995 Sep;121(2):192-203.
- ♣ Phillips, T.J., Wenger, C.D., Dorow, J.D., 1997. Naltrexone effects on ethanol drinking acquisition and on established ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 691-702.
- ♣ Pihl R.O., Peterson J.B. Etiology of drug addiction. *Annu Rev Addict Res Treat*, 2. 1992.
- ♣ Plata-Salamán, C.R., Ilyin, S.E., Turrin, N.P., Gayle, D., Flynn, M.C., Romanovitch, A.E., Kelly, M.E., Bureau, Y., Anisman, H., McIntyre, D.C., Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000. 75, 248-258.
- ♣ Ploj K, Roman E, Nylander I. Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience.* 2003;121(3):787-99
- ♣ Popp R.L., Erickson C.K. The effect of an acute ethanol exposure on the rat brain POMC opiopeptide system. *Alcohol.* 1998 Aug; 16(2): 139-48
- ♣ Portoghese P.S., Sultana M., Nagase H., Takemori A.E. A highly selective $\delta 1$ opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone, *Eur. J. Pharmacol.* 218. 1992: 195-6.
- ♣ Przewlocka, B., Dziedzicka, M., Lason, W., 1990. The effects of ethanol treatment on endogenous opioid peptides level and analgesia in monoarthritic rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 42, 343-349.
- ♣ Rasmussen D.D., Bryant C.A., Boldt B.M., Colasurdo E.A., Levin N., Wilkinson Ch.W. Acute alcohol effects on opioimelanocortinergic regulation, *Alcohol Clin Exp Res*, 22. 1998: 789-801.
- ♣ Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Mitton DR. Chronic daily ethanol and withdrawal: 3. Forebrain pro-opiomelanocortin gene expression and implications for dependence, relapse, and deprivation effect. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002 Apr;26(4):535-46.
- ♣ Rassnick S, Stinus L, Koob GF. The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat. *Brain Res.* 1993a Sep 24;623(1):16-24.
- ♣ Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I., Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned μ -, δ -, and κ -opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 45. 1994: 330-334.
- ♣ Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science.* 1995 Nov 3;270(5237):792-4.
- ♣ Rees, L.H., Cook, D.M., Kendall, J.W., Allen, C.F., Kramer, R.M., Ratcliffe, J.G., Knight, R.A., 1971. A radioimmunoassay for rat plasma ACTH. *Endocrinology* 89, 254-261.

- ♣ Richardson, H.N., Lee, S.Y., O'Dell, L.E., Koob, G.F., Rivier, C.L., 2008. Alcohol self-administration acutely stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but alcohol dependence leads to a dampened neuroendocrine state. *Eur J Neurosci* 28, 1641-1653.
- ♣ Risinger F.O., Brown M.M., Doan A.M., Oakes R.A. Mouse strain differences in oral operant ethanol reinforcement under continuous access conditions, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22. 1998: 677-684.
- ♣ Roberts A.J., McDonald J.S., Heyser C.J., Kieffer B.L., Matthes H.W.D., Koob G.F., Gold L.H. μ -opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293. 2000: 1002-1008.
- ♣ Roberts AJ, Gold LH, Polis I, McDonald JS, Filliol D, Kieffer BL, Koob GF. Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001 Sep;25(9):1249-56.
- ♣ Robinson, D.L., Carelli, R.M., 2008. Distinct subsets of nucleus accumbens neurons encode operant responding for ethanol versus water. *Eur J Neurosci* 28, 1887-94.
- ♣ Rodd-Henricks Z.A., McKinzie D.L., Crile R.S., Murphy J.M., McBride W.J. Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Apr; 149(3): 217-24.
- ♣ Rónai AZ, Király K, Szebeni A, Szemenyei E, Prohászka Z, Darula Z, Tóth G, Till I, Szalay B, Kató E, Barna I. Immunoreactive endomorphin 2 is generated extracellularly in rat isolated L4,5 dorsal root ganglia by DPP-IV. *Regul Pept.* 2009 Oct 9;157(1-3):1-2.
- ♣ Rosin A, Kitchen I, Georgieva J. Effects of single and dual administration of cocaine and ethanol on opioid and OPR1 receptor expression in rat CNS: an autoradiographic study. *Brain Res.* 2003 Jul 18;978(1-2):1-13.
- ♣ Ross E.M. G proteins and receptors in neuronal signalling. In: *An Introduction to Molecular Neurobiology*. Ed. Z. W. Hall. Sunderland, Mass., Sinauer, 1992: 181-206.
- ♣ Rossier, J., Vargo, T.M., Minick, S., Ling, N., Bloom, F.E., Guillemin, R., 1977. Regional dissociation of beta-endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5162-5165.
- ♣ Saland, L.C., Abeyta, A., Frausto, S., Raymond-Stintz, M., Hastings, C.M., Carta, M., Valenzuela, C.F., Savage, D.D., 2004. Chronic ethanol consumption reduces delta- and mu-opioid receptor-stimulated G-protein coupling in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 28, 98-104.
- ♣ Salih, H., Panerai, A.E., Friesen, H.G., Cellular distribution of beta-endorphin-like substance in the rat pituitary and brain. *Life Sci.* 1979. 25, 111-117.
- ♣ Samson HH, Tolliver GA, Haraguchi M, Hodge CW. Alcohol self-administration: role of mesolimbic dopamine. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Jun 28;654:242-53.
- ♣ Saravia F, Ase A, Aloyz R, Kleid MC, Ines M, Vida R, Nahmod VE, Vindrola O. Differential posttranslational processing of proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: evidence for synenkephalin cleavage. *Endocrinology.* 1993 Apr;132(4):1431-7.
- ♣ Satoh M, Minami M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther.* 1995;68(3):343-64.
- ♣ Schulz R., Wuster M., Duka T., Herz A. Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology (Berl)*. 1980; 68(3): 221-7.
- ♣ Schwartz J.C., Malfroy B. y de la Baume S. Biological inactivation of enkephalins and role dipeptidyl carboxipeptidase ("enkephalinase"), *Life Sci* 29 (17). 1981: 1715-40.
- ♣ Seizinger B.R., Bovermann K., Höllt V., Herz A., 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.
- ♣ Seizinger B.R., Bovermann K., Maysinger D., Hollt V., Herz A. Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid systems in discrete regions of rat brain and pituitary, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18. 1983: 361-369.
- ♣ Shahabi NA, Linner KM, Sharp BM. Murine splenocytes express a naloxone-insensitive binding site for beta-endorphin. *Endocrinology.* 1990 Mar;126(3):1442-8.
- ♣ Shippenberg TS, Herz A. Motivational effects of opioids: influence of D-1 versus D-2 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1988 Jul 7;151(2):233-42.

- ♣ Shoaib, M., Spanagel, R., Stohr, T., Shippenberg, T.S., 1995. Strain differences in the rewarding and dopamine-releasing effects of morphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 117, 240-247.
- ♣ Shoemaker WJ, Vavrousek-Jakuba E, Arons CD, Kwok FC. The acquisition and maintenance of voluntary ethanol drinking in the rat: effects of dopaminergic lesions and naloxone. *Behav Brain Res.* 2002 Dec 2;137(1-2):139-48.
- ♣ Sim-Selley, L.J., Sharpe, A.L., Vogt, L.J., Brunk, L.K., Selley, D.E., Samson, H.H., 2002. Effect of ethanol self-administration on mu- and delta-opioid receptor-mediated G-protein activity. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 688-694.
- ♣ Simon E.J., Hiller J.M., Edelman I., Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic 3H-etorphine to rat brain homogenate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70. 1973: 1947-1949.
- ♣ Simonds W.F. The molecular basis of opioid receptor function. *Endocr Rev.* 1988 May; 9(2): 200-12.
- ♣ Sinclair J.D. High and low drinking rat lines: contributions to current understanding and future development. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996 Nov; 20(8 Suppl): 109A-112A.
- ♣ Skinner B.F. *Science and Human Behavior*, McMillan, Nueva York, 1953.
- ♣ Soini S.L., Honkanen A., Hyttiä P., Korpi E.R. [3H]Ethylketacyclazocine binding to brain opioid receptor subtypes in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats, *Alcohol* 18. 1999: 27-34.
- ♣ Soini SL, Ovaska T, Honkanen A, Hyttiä P, Korpi ER. Brain opioid receptor binding of [3H]CTOP and [3H]naltrindole in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol.* 1998 Apr;15(3):227-32.
- ♣ Spanagel R., Herz A., Shippenberg T.S. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89. 1992: 2046-2050.
- ♣ Spanagel R., Herz A., Shippenberg T.S. The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 1990 Nov; 55(5): 1734-40.
- ♣ Spyraiki C., Fibiger H.C., Phillips A.G. Attenuation of heroin reward in rats by disruption of the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology (Berl).* 1983; 79(2-3): 278-83.
- ♣ Strand F.L. *Neuropeptides*, Massachusetts Institute of technology, 1999.
- ♣ Stromberg, M.F., Casale, M., Volpicelli, L., Volpicelli, J.R., O'Brien, C.P., A comparison of the effects of the opioid antagonists naltrexone, naltrindole, and beta-funaltrexamine on ethanol consumption in the rat. *Alcohol* 1998. 15, 281-289.
- ♣ Svingos A.L., Clarke C.L., Pickel V.M., Cellular sites for activation of delta-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: relationship with Met5-enkephalin. *J Neurosci.* 1998 Mar 1; 18(5): 1923-33.
- ♣ Terenius L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain, *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 33. 1973: 377-84.
- ♣ Terskiy A, Wannemacher KM, Yadav PN, Tsai M, Tian B, Howells RD. Search of the human proteome for endomorphin-1 and endomorphin-2 precursor proteins. *Life Sci.* 2007 Nov 30;81(23-24):1593-601.
- ♣ The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) Project, NINDS Contract # N01NS02331 to The Rockefeller University (New York, NY).
- ♣ Troland, L.T. (1928). *The Fundamentals of Human Motivation*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- ♣ Turchan J., Przewlocka B., Toth G., Lason W., Borsodi A., Przewlocki R. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience.* 1999; 91(3): 971-7.
- ♣ Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci.* 2004 Apr;19(7):1826-36.
- ♣ Vega R. Opioides: neurobiología, usos médicos y adicción. *Elementos* No. 60, Vol. 12, Octubre-Diciembre, 2005: 11
- ♣ Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol.* 2008 May;154(2):299-315. Epub 2008 Mar 3.

- ♣ Volpicelli J.R., Alterman A.I., Hayashida M., O'Brien C.P. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence, *Arch. Gen. Psychiatry* 49. 1992: 876-880.
- ♣ Wand GS, Mangold D, El Deiry S, McCaul ME, Hoover D. Family history of alcoholism and hypothalamic opioidergic activity. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Dec;55(12):1114-9.
- ♣ Wang J.B., Johnson P.S., Persico A.M. Human mu-opiate receptor-cDNA and genomic clones, pharmacological characterization and chromosomal assignment, *FEBS Lett.* 338. 1994: 217-22.
- ♣ Wang Z, Arden J, Sadée W. Basal phosphorylation of mu opioid receptor is agonist modulated and Ca²⁺-dependent. *FEBS Lett.* 1996 May 27;387(1):53-7.
- ♣ Welch, C.C., Kim, E.M., Grace, M.K., Billington, C.J., Levine, A.S., Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic Dynorphin peptide and mRNA levels. *Brain Res* 1996. 721, 126-31.
- ♣ Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* 1998 Dec; 80(3):231-64. Review
- ♣ Wheeler, R.A., Carelli, R.M., Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. *Neuropharmacology* 2009. 56 Suppl,149-59.
- ♣ White JD, Stewart KD, Krause JE, McKelvy JF. Biochemistry of peptide-secreting neurons. *Physiol Rev.* 1985 Jul;65(3):553-606.
- ♣ Wise R.A. Action of drugs of abuse on brain reward systems, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (supl. 1). 1980: 213-23.
- ♣ Wise, R.A. & Bozarth, M.A. (1984). Brain reward circuitry: Four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Research Bulletin* 297: 265-273.
- ♣ Wise, R.A., Rompre, P.P., Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* 1989. 40, 191-225.
- ♣ Xiao C, Shao XM, Olive MF, Griffin WC 3rd, Li KY, Krnjević K, Zhou C, Ye JH. Ethanol facilitates glutamatergic transmission to dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Jan;34(2):307-18. Epub 2008 Jul 2.
- ♣ Xiao C, Ye JH. Ethanol dually modulates GABAergic synaptic transmission onto dopaminergic neurons in ventral tegmental area: role of mu-opioid receptors. *Neuroscience.* 2008 Apr 22;153(1):240-8. Epub 2008 Feb 6.
- ♣ Xiao C, Zhou C, Li K, Davies DL, Ye JH. Purinergic type 2 receptors at GABAergic synapses on ventral tegmental area dopamine neurons are targets for ethanol action. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Oct;327(1):196-205. Epub 2008 Jun 26.
- ♣ Yasuda K., Espinosa R. 3rd, Takeda J., Le Beau M.M., Bell G.I. Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2., *Genomics.* Feb;19(3). 1994: 596-7.
- ♣ Yim HJ, Robinson DL, White ML, Jaworski JN, Randall PK, Lancaster FE, Gonzales RA. Dissociation between the time course of ethanol and extracellular dopamine concentrations in the nucleus accumbens after a single intraperitoneal injection. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000 Jun;24(6):781-8.
- ♣ Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature.* 1997 Apr 3;386(6624):499-502.
- ♣ Zalewska-Kaszubska, J., Czarnecka, E., Deficit in beta-endorphin peptide and tendency to alcohol abuse. *Peptides* 2005. 26, 701-705.
- ♣ Zhang L, Yu Y, Mackin S, Weight FF, Uhl GR, Wang JB. Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters. *J Biol Chem.* 1996 May 10;271(19):11449-54.
- ♣ Zhou, Y., Spangler, R., LaForge, K.S., Maggos, C.E., Ho, A., Kreek, M.J., Modulation of CRF-R1 mRNA in rat anterior pituitary by dexamethasone: correlation with POMC mRNA. *Peptides* 1996. 17, 435-441.
- ♣ Zhou Y, Franck J, Spangler R, Maggos CE, Ho A, Kreek MJ. Reduced hypothalamic POMC and anterior pituitary CRF1 receptor mRNA levels after acute, but not chronic, daily "binge" intragastric alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000 Oct;24(10):1575-82.
- ♣ Zigmund M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R. *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, London. 1999: 1267-1270.

ANEXO I

ACUTE ETHANOL INDUCES Fos IN GABAergic AND NON-GABAergic FOREBRAIN NEURONS: A DOUBLE-LABELING STUDY IN THE MEDIAL PREFRONTAL CORTEX AND EXTENDED AMYGDALA

M. LERICHE,^b M. MÉNDEZ,^b L. ZIMMER^a
AND A. BÉROD^{a*}

^aLaboratoire de Neuropharmacologie, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, FRE CNRS 3006, 69373 Lyon, France

^bInstituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México DF, Mexico

Abstract—The purpose of this study was to further address the hypothesis that ethanol activates GABAergic neurons in specific brain neurocircuits that mediate motivated behavior and control of action, such as the central extended amygdala and medial prefrontal cortex. Male Sprague–Dawley rats received habituation to 7 days of daily intragastric administration of water (5 ml/kg) followed by a single acute intragastric dose of ethanol (2.5 g/kg) or water then, 2 h later, by paraformaldehyde perfusion. Rats left undisturbed in the animal room throughout the experiment were also perfused (naive group). Brain sections were processed for single Fos immunohistochemistry or dual Fos immunohistochemistry/glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA *in situ* hybridization. Intragastric water administration increased the number of Fos-immunoreactive cells in the infralimbic cortex and lateral part of the central nucleus of the amygdala compared with the naive group. Ethanol administration increased the number of Fos-immunoreactive cells in the infralimbic (+57.5%) and prelimbic (+105.3%) cortices, nucleus accumbens shell region (+88.2%), medial part of the central nucleus of the amygdala (+160%), and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis (+198.8%) compared with the water-treated group. In the nucleus accumbens shell region, central nucleus of the amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis, more than 80% of Fos-immunoreactive neurons were GABAergic after ethanol administration. In contrast, in the prelimbic cortex, 75% of Fos-immunoreactive neurons were not GABAergic. These results constitute new evidence for region-specific functional interactions between ethanol and GABAergic neurons. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: alcohol, glutamic acid decarboxylase, *in situ* hybridization, nucleus accumbens, bed nucleus of the stria terminalis, central nucleus of the amygdala.

Ethanol has complex pharmacological properties that include alteration of the function of many brain proteins such as the ligand-gated ion receptor channels GABA, *N*-methyl-D-aspartate, and nicotinic receptors (reviewed in Luscher

*Corresponding author. Tel: +33-478-777-553; fax: +33-478-777-209. E-mail address: aberod@sante.univ-lyon1.fr (A. Bérod).
Abbreviations: GAD, glutamic acid decarboxylase; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate buffer saline; PBST, phosphate buffer saline with 0.3% Triton X-100.

0306-4522/08/\$32.00+0.00 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.069

and Ungless, 2006). Elucidating the mechanisms by which the varied properties of ethanol combine to affect the neuronal circuits that underlie abnormal patterns of alcohol use remains one of the most difficult challenges faced by alcohol-addiction research.

Although the brain circuitry underlying addiction is complex, it is clear that the mesolimbic dopaminergic system plays a critical role in mediating the rewarding properties of drugs of abuse (review in Hyman et al., 2006). This dopaminergic system originates in the ventral tegmental area and projects to limbic structures such as the nucleus accumbens, amygdala, and frontal cortex. Effects of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area include an increase in firing rate (Gessa et al., 1985), long-lasting adaptations at excitatory synapses (Saal et al., 2003), and stimulation of dopamine release in their terminal areas such as the nucleus accumbens (Di Chiara and Imperato, 1988). Pharmacological manipulation of this pathway using systemic and local administration of dopamine-receptor agents has established a key role for mesolimbic dopaminergic system activity in ethanol-intake behavior (Samson et al., 1993; Kaczmarek and Kiefer, 2000; Nowak et al., 2000). However, other neurochemical systems acting either directly or indirectly via this dopaminergic pathway are involved in mediating various aspects of alcohol addiction (review in Gonzales et al., 2004).

A strong body of evidence from pharmacological, electrophysiological, and behavioral studies points to a GABAergic component in the rewarding and anxiolytic effects of ethanol, which may be mediated by the extended amygdala (reviews in Koob, 2004 and in Criswell and Breese, 2005). Various studies have shown that GABA_A receptor agonists facilitate the acquisition of voluntary ethanol drinking in rats (Smith et al., 1992; Boyle et al., 1993). Conversely, systemic administration of GABA_A antagonists and a benzodiazepine-partial inverse agonist reduced voluntary alcohol intake (Samson et al., 1987; Boyle et al., 1993; Rassnick et al., 1993; Petry, 1995) and decreased ethanol-induced sedation (Ticku and Kulkarni, 1988; McCown and Breese, 1989). In addition, microinjection of GABA_A receptor antagonists into the ventral tegmental area, medial prefrontal cortex, or central extended amygdala (central nucleus of the amygdala, bed nucleus of the stria terminalis, and shell region of the nucleus accumbens) resulted in significant decreases in voluntary ethanol intake (Hyytia and Koob, 1995; Nowak et al., 1998; Samson and Chappell, 2001), suggesting that the reinforcing properties of ethanol may be mediated, at least in part, by GABA transmission in these specific brain regions.

Ethanol has been suggested to modulate GABAergic transmission through various mechanisms. Early studies showed that acute and long-term ethanol exposure mainly induced alterations in postsynaptic GABA_A receptors (review in Criswell and Breese, 2005). However, increasing evidence demonstrated that, in addition to these postsynaptic effects, ethanol potentiated GABA release via direct action on presynaptic sites (Criswell and Breese, 2005; Breese et al., 2006 for reviews). For instance, acute ethanol increased the frequency of spontaneous miniature inhibitory post-synaptic currents recorded in the ventral tegmental area (Melis et al., 2002), basolateral and central nucleus of the amygdala (Roberto et al., 2003; Zhu and Lovinger, 2006), and cortex (Marszalec et al., 1998; Moriguchi et al., 2007), indicating that ethanol stimulated spontaneous GABA release. In addition, acute ethanol administration *in vivo* produced a dose-dependent increase in GABA release in the central nucleus of the amygdala (Roberto et al., 2004). Furthermore, neuroanatomical studies using immunodetection of Fos as a marker of neuronal activation demonstrated that acute systemic ethanol administration activated several brain regions, including the bed nucleus of the stria terminalis, paraventricular nucleus of the hypothalamus, central nucleus of the amygdala, Edinger-Wesphal nucleus, and nucleus accumbens (Chang et al., 1995; Ryabinin et al., 1997; Morales et al., 1998; Criado and Morales, 2000; Ryabinin et al., 2000). However, it is not known if these neurons are GABAergic, with the exception of a neuron subpopulation in the central nucleus of the amygdala (Morales et al., 1998; Criado and Morales, 2000).

Therefore, the purpose of this study was to further address the hypothesis that ethanol activates GABAergic neurons in specific brain neurocircuits that mediate motivated behavior, such as the central division of the extended amygdala and the medial prefrontal cortex. First, we evaluated the effect of intragastric administration of 2.5 g/kg ethanol on neuronal activation, as measured by Fos-immunohistochemistry, in the infralimbic and prelimbic subregions of the medial prefrontal cortex and in the central division of the extended amygdala, including the shell region of the nucleus accumbens, the lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis, and the central nucleus of the amygdala. Then, we sought to determine the chemical identity of the activated neurons using a dual Fos immunohistochemistry and glutamate decarboxylase (GAD) mRNA *in situ* hybridization procedure.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental animals

Adult male Sprague–Dawley rats (Harlan France, Gannat, France) weighing 250–285 g at the beginning of the experiment were housed in groups of five and maintained in a humidity- and temperature-controlled environment on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.). Animals had free access to food and water throughout the experiment. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. All experimental procedures were performed in accordance with the European Community Council Directives (86/609/EEC) and the French

guide-lines (Act 87-848, Ministère de l'Agriculture) for the care and use of laboratory animals.

Experimental design and procedures

Animal procedures were as previously described (Mendez et al., 2001; Wilkie et al., 2007). In brief, animals were randomly divided into three groups of five animals each, which were given ethanol, water, or neither, respectively. Animals in the ethanol and water groups were habituated to intragastric fluid administration by gavage with distilled water (5 ml/kg) once a day for 7 days. Animals in the group given neither ethanol nor water (naive group) were left undisturbed in the animal room throughout the experiment. On the day after the habituation period, animals in the ethanol and water groups were given a single dose of ethanol (2.5 g/kg; 5 ml ethanol 50% weight/volume per kg) or distilled water (5 ml/kg), respectively, between 11:30 A.M. and 1:30 P.M., then returned to their cages. In ethanol-treated group, plasma alcohol levels peaked 30 min after its administration (50 mg/dL) and then decreased progressively to reach basal levels 8 h later (Mendez et al., 2001).

Two hours later, they were anesthetized with *i.p.* sodium pentobarbital (50 mg/kg) and perfused through the left ventricle with saline containing 0.1% heparin followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffer solution (PB), pH 7.4. Naive rats were also perfused. The brains were rapidly removed, placed in fresh fixative overnight, cryoprotected in 0.1 M PB containing 30% sucrose at 4 °C, and frozen for 3 min in isopentane at –30 °C. Coronal sections (30 μm thick) cut on a freezing microtome along the forebrain and midbrain were immersed in a solution containing 50 mM PB, 30% ethylene glycol, 20% glycerol, then stored at –20 °C for subsequent processing.

Probe synthesis

The rat GAD67 probes used in this study were digoxigenin-labeled riboprobes about 2 kb in length. The recombinant plasmid containing the GAD67 cDNA (Julien et al., 1987) was linearized using *EcoRV* for the antisense probe or *HindIII* for the sense probe and transcribed using SP6 (antisense probe) or T7 (sense probe) RNA polymerase and a non-radioactive RNA labeling kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). After precipitation in 75% ethanol, the labeled probe was dried, dissolved in the hybridization buffer, aliquoted, and stored at –20 °C until use.

Fos immunohistochemistry and GAD mRNA *in situ* hybridization

Fos immunohistochemistry was performed as previously described (Colussi-Mas et al., 2007). Briefly, a 1-in-8 series of free-floating tissue sections was taken for each animal, rinsed three times for 10 min each time in 10 mM PB containing 0.9% NaCl (phosphate buffer saline, PBS) and incubated for 24 h with the primary rabbit Fos antibody (Oncogene Research Products, Darmstadt, Germany) diluted 1/5000 in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBST) and 1% bovine serum albumin. Sections were subsequently rinsed with PBST (3×10 min) and similarly rinsed after each step. Sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) diluted 1/1000 in PBST and incubated with an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories) for 60 min. Fos immunoreactivity was visualized with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.003% H₂O₂ to yield a brown nuclear deposit. The reaction was stopped by three washes with PBST. Sections single-stained for Fos were counterstained with Neutral Red.

Sections used for double labeling (Fos and GAD mRNA) were processed for Fos immunohistochemistry as previously described except that RNase inhibitor was added to all solutions (2 μl/ml of protectRNA™ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and sections

were treated with 10 mM dithiothreitol for 10 min prior to hybridization. Sections were hybridized overnight at 65 °C in a hybridization buffer consisting of Tris–HCl pH 7.4, EDTA (50 mM), NaCl (150 mM), formamide (50%), ARNt (1 mg/ml), dextran sulfate (10%), and Denhart's solution (1×) containing 0.05 µg/ml of the digoxigenin-labeled probe. After hybridization, the sections were washed twice in 1× sodium chloride/sodium citrate, 50% formamide, and 0.1% Tween-20, at 65 °C for 20 min each time, then treated for 30 min at 37 °C with 20 µg/ml RNaseA in Tris–HCl 10 mM pH 8.0 containing 1 mM EDTA and 500 mM NaCl. Sections were then rinsed 3×10 min at room temperature with PBST. For immunological digoxigenin detection, sections were incubated overnight at room temperature with anti-digoxigenin conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostic) diluted 1/2000 in PBST containing 1% bovine serum albumin. After incubation, the sections were washed in PBST and developed at 37 °C for 3–8 h in buffer containing 100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1% Tween-20 with NBT-BCIP (Roche Diagnostic) to yield a dark-blue reaction product. Neurons were considered double labeled if their nuclei were brown and their cytoplasm blue. The sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried and coverslipped with Vectamount (Vector Laboratories).

Images were captured using a light microscope (Axioskop 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a digital camera (Nikon Coolpix E995, Tokyo, Japan). All images were imported into Adobe Photoshop, adjusted for contrast and assembled into plate.

Cell counts and analysis

Bright field images of sectioned material were viewed with a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped with an X/Y sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercador, Explora Nova, La Rochelle, France). The planes of the analyzed sections were standardized according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). Sample areas were taken at bregma levels of 2.70 mm to 2.2 mm from the medial prefrontal cortex, 1.20 mm to 0.70 mm from the nucleus accumbens, –0.20 mm to –0.60 mm from the lateral bed nucleus of the stria terminalis, –1.6 mm to 1.8 mm and –2.56 mm to 2.8 mm from the medial and lateral parts of central nucleus of the amygdala respectively, and –1.80 mm to –1.88 mm from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Fos-immunoreactive cells and Fos-immunoreactive/GAD mRNA double-labeled cells were counted bilaterally on one to four sections per animal, depending on the rostro-caudal length of the structure examined. For each rat, the mean cell counts were determined and used for statistical analyses.

For Fos single-stained cells, one-way analysis of variance was performed and a post hoc Fisher test was used to identify significant pairwise differences. For double-labeled sections, the mean numbers of Fos/GAD double-labeled cells and Fos single-labeled cells in the prelimbic area were compared using an unpaired *t*-test. Values of *P* smaller than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Acute ethanol administration increased Fos immunoreactivity in the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens shell region, medial part of the central nucleus of the amygdala, and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis

Fos-immunoreactive neurons in counterstained sections of ethanol-treated animals were scattered throughout the layers of the infralimbic and prelimbic cortices (Fig. 1B), although they were scarce in layer I. Within the nucleus accumbens, Fos-immunoreactive neurons were distrib-

uted throughout the shell and core subdivisions rostrally, whereas caudally they tended to concentrate in the mediodorsal area of the shell (Fig. 1D). Fos-immunoreactive cells were more numerous dorsally in the lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis (Fig. 1F). In the central nucleus of the amygdala, Fos-immunoreactive neuron counts were distributed in the medial and lateral parts, being however highest in the lateral part, and in particular its caudal portion (Fig. 1H). Although not quantified, Fos-immunoreactive neurons in these regions clearly represented a small proportion of all Neutral Red-stained cells, suggesting that only a small subset of neurons was affected by ethanol administration.

Quantification of Fos-immunoreactive neurons in the selected forebrain regions (Fig. 1A, C, E, G) revealed a significant treatment effect in both the prelimbic ($P < 0.005$) and the infralimbic ($P < 0.001$) regions of the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens shell region ($P < 0.05$), medial and lateral parts of the central nucleus of the amygdala ($P < 0.005$), and lateral bed nucleus of the stria terminalis ($P < 0.05$) but not in the nucleus accumbens core. More specifically, acute ethanol administration significantly increased the number of Fos-immunoreactive neurons in the prelimbic (+105.3%) and infralimbic (+57.5%) regions of the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens shell region (+88.2%), and lateral bed nucleus of the stria terminalis (+198.8%), compared with the group given water (Fig. 2A, B, D and E). In the medial part of the central nucleus of the amygdala, Fos-immunoreactive neurons were rather low even if their number was highly increased after ethanol administration (+160%, $P < 0.005$). As a control, Fos expression was also quantified in a cortical region thought not to participate in the development, maintenance or relapse to alcoholism. Quantification of Fos expression in the primary somatosensory cortex (at the level of the medial prefrontal cortex, Bregma +2.7 mm) indicated that ethanol increased by 60% ($P < 0.05$) the number of Fos-immunoreactive neurons in this area.

In contrast, ethanol administration did not significantly alter the number of Fos-immunoreactive neurons in the nucleus accumbens core (Fig. 2C) or lateral part of central nucleus of the amygdala (Fig. 2F) compared with the group given water. No significant change was observed in the basolateral complex and main part of the intercalated nucleus of the amygdala (data not shown). Water administration significantly increased the number of Fos-immunoreactive neurons only in the infralimbic region (+109.8%) (Fig. 2B) and lateral part of the central nucleus of the amygdala (+313.9%), compared with the naive group (Fig. 2F).

To assess whether intragastric gavage induced stress, we also quantified Fos immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, a brain region known to be highly sensitive to stressful events (Senba and Ueyama, 1997). No significant difference between naive and water-treated rats was noted regarding the number of Fos-immunoreactive neurons in this nucleus (naive group, 31.75 ± 7.41 , $n=4$; water group, 27.5 ± 3.12 , $n=4$).

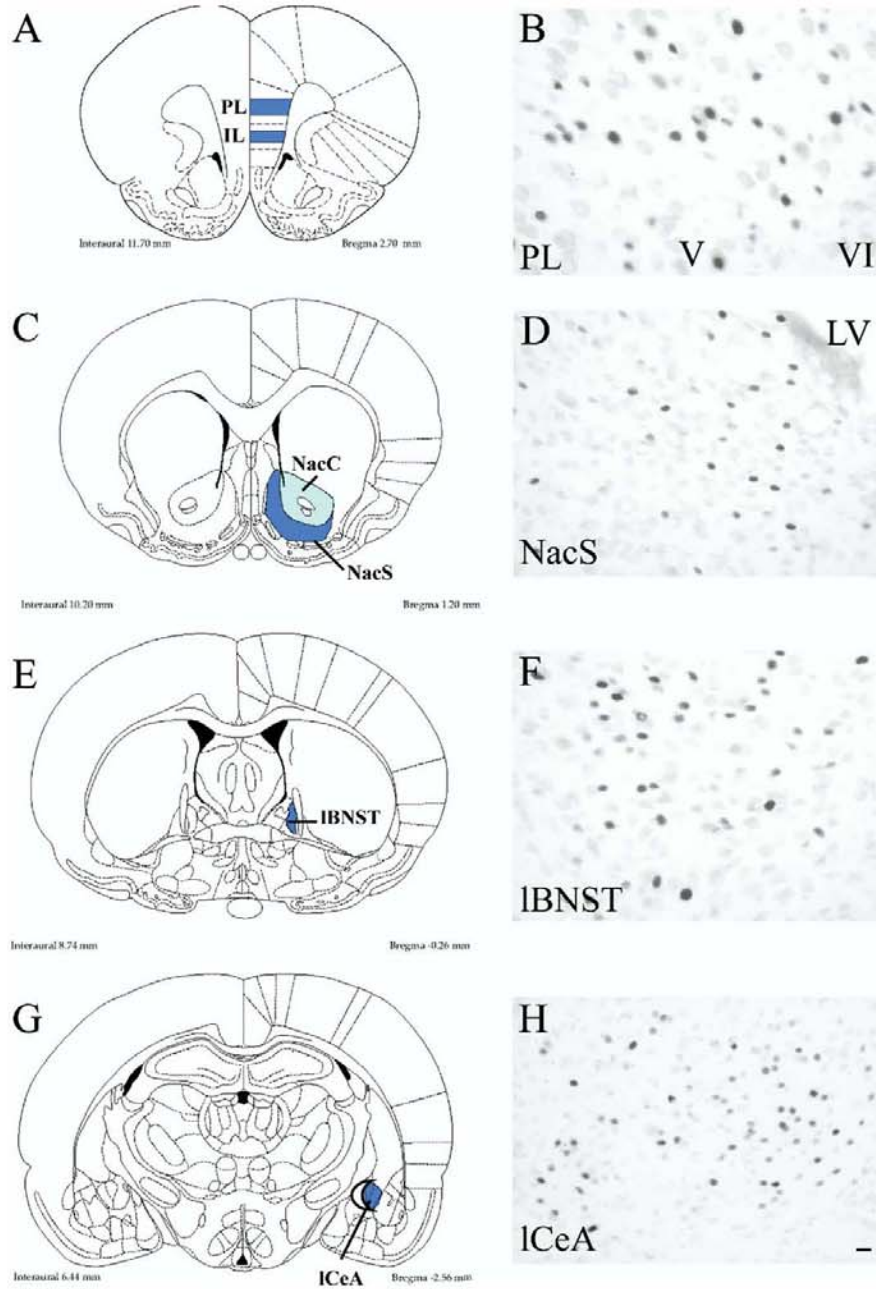


Fig. 1. Fos immunoreactivity in the extended amygdala and medial prefrontal cortex after ethanol administration (2.5 g/kg intragastrically). (A, C, E, G) Schematic representations of coronal sections through the forebrain indicating the localization of the sample areas used for quantitation of Fos-immunoreactive neurons (adapted from the atlas of Paxinos and Watson, 1998). (B, D, F, H) Photomicrographs showing the distribution of Fos-immunoreactive neurons in the prelimbic medial prefrontal cortex (PL), shell of the nucleus accumbens (NacS), lateral region of the bed nucleus of the stria terminalis (IBNST), and lateral part of the central amygdala (ICeA) after ethanol administration. Sections were counterstained with Neutral Red. LV: lateral ventricle, V and VI, respectively layers V and VI of the cortex. Scale bar = 20 μ m in H.

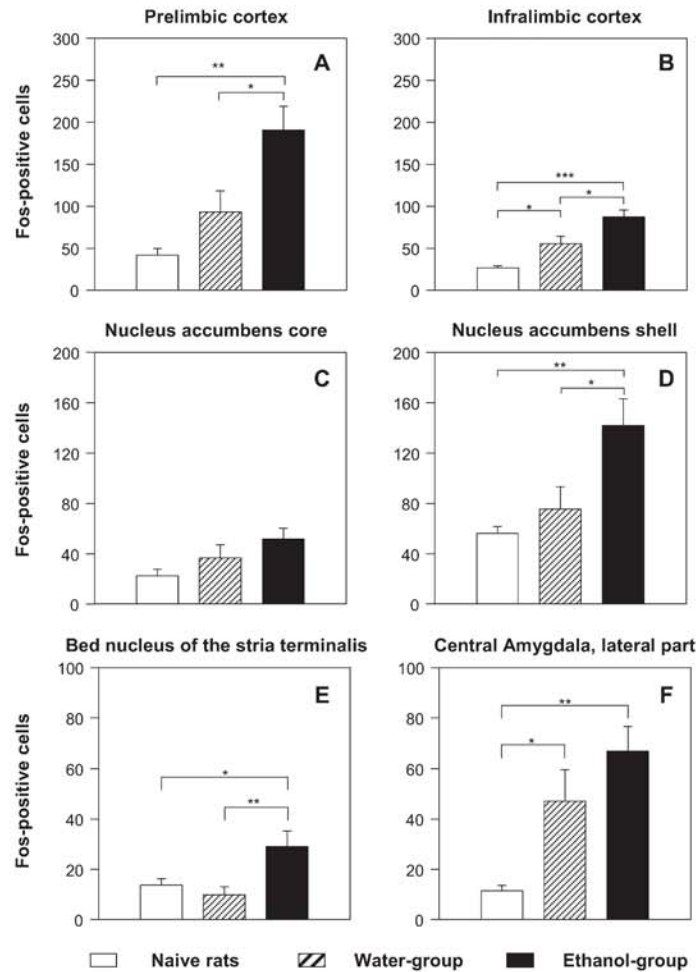


Fig. 2. Effect of acute ethanol administration on Fos expression in selected areas of the extended amygdala and medial prefrontal cortex. Data are expressed as the number of Fos-immunoreactive neurons per structure and are the mean values \pm S.E.M. of four to six animals. *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Fos expression and GABAergic neurons

Since ethanol administration increased the number of Fos-immunoreactive neurons in the medial prefrontal cortex and subdivisions of the central extended amygdala, we examined the phenotype of these neurons by performing a dual double labeling for Fos and GAD via Fos-IR/GAD mRNA *in situ* hybridization. Single GAD mRNA *in situ* hybridization with the antisense GAD probe showed widespread distribution of GAD-expressing neurons, as previously described (Esclapez et al., 1993). Briefly, GAD-labeled cells in the forebrain were scattered throughout the cortex and were abundant, albeit with a lower level of staining, in the striatum and nucleus accumbens. A large number of GAD-expressing neurons were also observed in the septum, diagonal band of Broca, globus pallidus, hypothalamus, and hippocampus. The ventromedial and paraventricular

hypothalamic nuclei and the thalamic nuclei (except for the reticular nucleus, which was heavily stained) were unlabeled. No labeling was observed following *in situ* hybridization with the sense probe.

After processing for Fos immunohistochemistry, the distribution of GAD-expressing neurons in the brain was virtually identical. In the medial prefrontal cortex, careful examination of the number of GAD-expressing cells after single- and double-labeling procedures indicated that Fos-immunohistochemistry did not significantly affect the subsequent detection of GAD mRNA-containing cells, so that underestimation of Fos/GAD neurons with the double-staining procedure was unlikely to occur (Fig. 3). As previously observed on sections single-stained for Fos (Fig. 2A), the total number of Fos-immunoreactive cells (single- and double-labeled Fos cells) in the prelimbic was

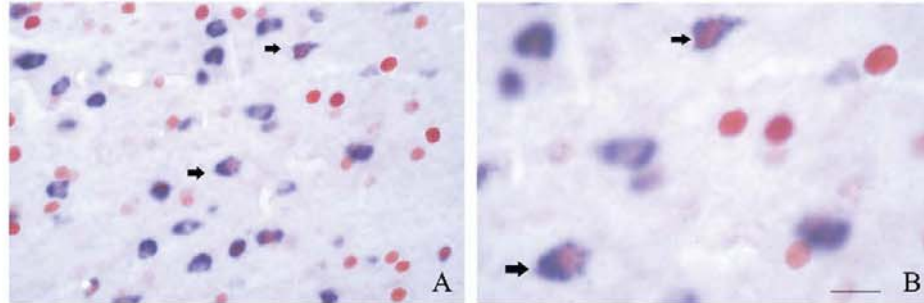


Fig. 3. Representative photomicrographs of Fos and GAD mRNA-labeled sections after ethanol administration (2.5 g/kg). Photomicrograph B is an enlargement of photomicrograph A. The brown color indicates Fos-immunoreactivity in the nucleus, whereas blue labeling indicates presence of GAD mRNA in the cytoplasm. Arrowheads point to double-labeled cells. Scale bar=20 μ m in B. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

significantly higher in the ethanol group compared with the water group ($P < 0.005$) (Fig. 4). Interestingly, the two populations of Fos-labeled cells, i.e. positive for both Fos and GAD, and positive for Fos but negative for GAD, showed similar significant increases after ethanol administration (+55%, $P < 0.05$; and +64%, $P < 0.001$, respectively, relative to the water group) (Fig. 4). As illustrated in Figs. 3 and 4, the proportion of Fos/GAD double-labeled cells relative to the total number of Fos-positive cells in the prelimbic cortex was relatively low, about 25%–26% in both groups of rats.

In the shell region of the nucleus accumbens, central nucleus of the amygdala, and the lateral bed nucleus of the stria terminalis, more than 80% of the Fos-immunoreactive neurons were GABAergic in the water and ethanol groups. An accurate quantitative analysis of the data was difficult, however, since the high density of GABAergic neurons in these regions often hampered the visualization of Fos-

immunoreactive neurons. In all regions, Fos/GAD double-labeled cells contributed a very small proportion of all GAD mRNA-labeled cells.

DISCUSSION

The present study was conducted to further identify the neural systems that mediate early effects of alcohol on the brain. Our results show that acute *in vivo* ethanol exposure rapidly induces Fos expression in neurons located at several sites of the central division of the extended amygdala (nucleus accumbens shell, medial part of the central nucleus of the amygdala, and lateral bed nucleus of the stria terminalis) and in the infralimbic and prelimbic parts of the medial prefrontal cortex. Furthermore, using a double-labeling histochemical procedure to identify GAD mRNA- and Fos-expressing cells, we showed that ethanol mainly stimulated inhibitory GABAergic neurons in the central extended amygdala but activated both GABAergic and non-GABAergic neurons in the medial prefrontal cortex.

Our data regarding Fos expression are generally consistent with the results of earlier studies that used this marker to evaluate brain areas activated by ethanol. Indeed, many studies consistently found that systemic or intracerebral ethanol administration was followed by Fos induction in the nucleus accumbens shell (Ryabinin et al., 1997; Bachtell and Ryabinin, 2001; Knapp et al., 2001; Crankshaw et al., 2003), lateral bed nucleus of the stria terminalis (Chang et al., 1995; Ryabinin et al., 1997; Knapp et al., 2001; Crankshaw et al., 2003), and infralimbic cortex (Ryabinin et al., 1997). Several reports indicated increased Fos expression in the central nucleus of the amygdala after systemic administration of similar doses of ethanol, but they did not provide separate quantification of Fos immunoreactivity in the lateral and medial part of this nucleus (Chang et al., 1995; Ryabinin et al., 1997; Morales et al., 1998; Knapp et al., 2001; Herring et al., 2004; Ryabinin et al., 2000). Our finding that acute ethanol enhanced Fos expression in the medial part of the central nucleus of the amygdala, but not in its lateral part, might be related to our experimental protocol. Indeed, control animals that received repeated intragastric water administration showed strong Fos

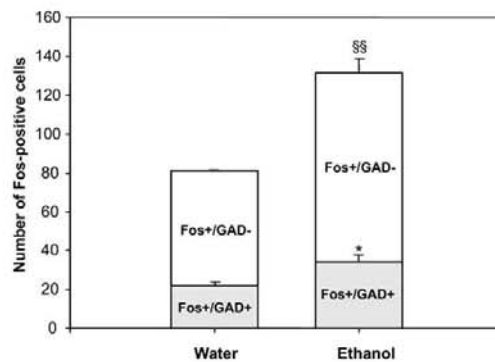


Fig. 4. Effect of acute ethanol administration (2.5 g/kg intragastrically) on Fos expression in GABAergic and non-GABAergic neurons of the prelimbic cortex. Complete bars indicate the total number of Fos-immunoreactive cells, black bars the number of neurons double labeled for Fos and GAD mRNA, and open bars the number of neurons labeled for Fos but not for GAD mRNA. Data are mean values \pm S.E.M. of three or four animals. * Indicates $P < 0.05$ relative to the water group for Fos and GAD mRNA double-labeled cells and §§ indicates $P < 0.005$ relative to the water group for the total number of Fos-immunoreactive cells (single- and double-labeled cells).

activation in the lateral subdivision of the central nucleus of the amygdala (+313.9%). This activation, which likely reflects the high sensitivity of the lateral rather than medial neurons of the central nucleus of the amygdala to visceral stimuli as reported using Fos immunohistochemistry (Yakabi et al., 2002; Nakagawa et al., 2003), may hamper the detection of a further Fos expression increase induced by ethanol. In fact, Fos activation was quantified by counting the number of Fos-labeled nuclei, an approach that did not allow measurement of changes in Fos expression in cells with high baseline levels of Fos expression.

Although Fos induction has proved a powerful tool for identifying brain regions activated by ethanol, few studies have investigated the chemical identity of the activated cell populations. Most of these studies focused on specific components of the central division of the extended amygdala. They showed that ethanol induced Fos in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala (Morales et al., 1998) that also express enkephalins (Criado and Morales, 2000), as well as in cholinergic neurons of the shell region of the nucleus accumbens (Herring et al., 2004). Our study extends these results, providing further anatomical information on the distribution and identity of neuronal systems recruited by acute ethanol exposure. We showed that systemic ethanol also caused rapid and robust Fos activation in a restricted subset of GABAergic neurons in the nucleus accumbens, medial part of the central nucleus of the amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis. This selectivity in GABAergic neuron reactivity to ethanol may be linked to the remarkable heterogeneity of this cell population. Within the nucleus accumbens, 90% to 95% of neurons are GABAergic medium-sized spiny projection neurons, which, however, vary in their connectivity and neurochemical features (Chang and Kitai, 1985; Voom et al., 1989; Rogard et al., 1993; Zahm and Heimer, 1993). The remaining interneurons, which provide input to the projection neurons, synthesize either acetylcholine or GABA and can be subdivided into several classes of interneurons based on the calcium-binding proteins they express (Kawaguchi et al., 1995). A similar organization has been described within the anterolateral part of the bed nucleus of the stria terminalis. This area also contains a high proportion of intrinsic and projection GABAergic neurons that co-express a wide variety of neuropeptides having their own characteristic distribution (Ju et al., 1989; Sun and Cassell, 1993; Day et al., 1999; Larriva-Sahd, 2006). Whether acute ethanol specifically targets one or several of these characterized subsets of GABAergic neurons remains to be determined. This is important, since activation of GABAergic neurons in these areas does not necessarily imply an increase in inhibitory output. Depending on the type of GABAergic neurons activated by ethanol in the nucleus accumbens shell and lateral bed nucleus of the stria terminalis, the overall output of these nuclei might be inhibitory (activation of GABAergic projection neurons) or excitatory (activation of GABAergic interneurons that inhibit the GABAergic output). The high heterogeneity of neurons in the central amygdala, in terms of connectivity and neurotransmitter phenotype (Cassell et al., 1986; Marchant et al., 2007;

Poulin et al., 2008) also requires further analysis to determine the characteristics of Fos-positive neurons.

We found that acute ethanol under the same experimental conditions induced Fos in two categories of cortical neurons. Contrary to our findings in subcortical areas, ethanol induced Fos predominantly in non-GABAergic neurons, which contributed 75% of Fos-labeled cells, whereas GABAergic neurons contributed only 25% of Fos-labeled cells. The prefrontal cortex contains two main cell types, glutamate-containing pyramidal projection neurons and GABA interneurons that exert local inhibitory control through input onto the pyramidal cells, thus regulating the pyramidal output of the prefrontal cortex (Rétaux et al., 1992; Gabbott et al., 1997; Somogyi et al., 1998). In a recent study using the vesicular glutamate transporter mRNA as a marker for glutamatergic cortical neurons, these neurons contributed about 75% of all Nissl-stained cells (Santana et al., 2004). The similarity between the proportion of glutamatergic neurons in the cortex and the proportion of non-GABAergic neurons that were activated in our study further suggests that these activated non-GABAergic neurons were glutamatergic. Thus, acute ethanol may simultaneously activate GABAergic interneurons and glutamatergic projection neurons of the medial prefrontal cortex, and this coordinated effect may contribute to a narrow selection of the activated glutamatergic cortical output.

Taken in concert, our data indicate that, apart from the well-documented direct post-synaptic effect of ethanol on GABA receptors, ethanol enhances GABAergic transmission by activating specific populations of GABAergic neurons via a circuit-dependent presynaptic effect. This dual effect is consistent with previous *in vivo* and *in vitro* data suggesting both presynaptic and postsynaptic sites of action for ethanol in the central extended amygdala (McBride, 2002; Roberto et al., 2003, 2004) and prefrontal cortex (Marszalec et al., 1998; Moriguchi et al., 2007). GABAergic neurotransmission enhancement in these areas may contribute to several aspects of ethanol consumption. Hyytia and Koob (1995) showed that bilateral injection of a GABA_A receptor antagonist into the nucleus accumbens, bed nucleus of the stria terminalis, or central nucleus of the amygdala decreased ethanol consumption. On the other hand, GABA_A receptor activation in the medial prefrontal cortex appears important in maintaining ethanol consumption (Samson and Chappell, 2001). The definitive identification of the activated non-GABAergic neurons in the medial prefrontal cortex, which are probably glutamatergic neurons, warrants further investigation, particularly given the anatomical and functional connections linking the cortical glutamatergic neurons to the reward system (Tzschentke, 2000).

Finally, it is interesting to note that addictive drugs such as psychostimulants, nicotine, morphine, and delta-9-tetrahydrocannabinol share the ability to induce robust activation of Fos and/or of factors critically involved in the induction of immediate early genes, such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), in a limited set of structures that largely match the Fos-expressing structures in our study, namely, the nucleus accumbens shell, central nu-

cleus of amygdala, lateral bed nucleus of the stria terminalis, and medial prefrontal cortex (Ostrander et al., 2003; Valjent et al., 2004). This apparently common pattern of cellular activation may be due in part to activation of dopaminergic receptors (Zang et al., 2004; Valjent et al., 2005) in brain areas where all addictive drugs enhance dopamine release. It also opens up the possibility that ethanol-induced immediate early genes in these specific brain regions may trigger long-lasting alterations that may contribute to the process of reward and addiction.

CONCLUSION

In conclusion, we showed that ethanol initially targets distinctive subsets of GABAergic neurons in the central extended amygdala and medial prefrontal cortex, where non-GABAergic neurons were also activated. How activation of these specific neuron populations contributes to establish ethanol consumption behaviors deserves further investigation.

Acknowledgments—This work was supported by the Claude Bernard Lyon 1 University and CONACYT 34359-N (M.M.), ANUIES/CONACYT-ECOS-Nord (M01S02). M. Leriche is a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, and received a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

- Bachtell RK, Ryabinin AE (2001) Interactive effects of nicotine and alcohol co-administration on expression of inducible transcription factors in mouse brain. *Neuroscience* 4:941–954.
- Boyle AE, Segal R, Smith BR, Amitz Z (1993) Bidirectional effects of GABAergic agonists and antagonists on maintenance of voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46:179–182.
- Breese GR, Criswell HE, Carta M, Dodson PD, Hanchar HJ, Khisti RT, Mamelmi M, Ming Z, Morrow AL, Olsen RW, Otis TS, Parsons LH, Penland SN, Roberto M, Siggins GR, Valenzuela CF, Wallner M (2006) Basis of the Gabamimetic profile of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 30:731–744.
- Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ (1986) Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 246:478–499.
- Chang HT, Kilai ST (1985) Projection neurons of the nucleus accumbens: an intracellular labeling study. *Brain Res* 347:112–116.
- Chang SL, Patel NA, Romero AA (1995) Activation and desensitization of Fos immunoreactivity in the rat brain following ethanol administration. *Brain Res* 679:89–98.
- Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm D, Bérrod A (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double labeling study. *Eur J Neurosci* 26:1011–1025.
- Crankshaw DL, Briggs JE, Olszewski PK, Shi Q, Grace MK, Billington CJ, Levine AS (2003) Effects of intracerebroventricular ethanol on ingestive behavior and induction of c-Fos immunoreactivity in selected brain regions. *Physiol Behav* 79:113–120.
- Criado JR, Morales M (2000) Acute ethanol induction of Fos immunoreactivity in pre-pro-enkephalin expressing neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 861:173–177.
- Criswell HE, Breese GR (2005) A conceptualization of integrated actions of ethanol contributing to its GABA-mimetic profile: a commentary. *Neuropsychopharmacology* 30:1407–1405.
- Day HE, Curran EJ, Watson SJ, Akil H (1999) Distinct neurochemical populations in the rat central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: evidence for their selective activation by interleukin-1beta. *J Comp Neurol* 413:113–128.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274–5278.
- Esdapez M, Tillakaratne NJ, Tobin AJ, Houser CR (1993) Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. *J Comp Neurol* 331:339–362.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 377:465–499.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348:201–203.
- Gonzales RA, Job MO, Doyon WM (2004) The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther* 103:121–146.
- Herning BE, Mayfield RD, Camp MC, Alcantara AA (2004) Ethanol-induced Fos immunoreactivity in the extended amygdala and hypothalamus of the rat brain: focus on cholinergic interneurons of the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res* 28:588–597.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598.
- Hyttia P, Koob GF (1995) GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol* 283:151–159.
- Ju G, Swanson LW, Simerly RB (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat. II. Chemoarchitecture. *J Comp Neurol* 280:603–621.
- Julien JF, Legay F, Dumas S, Tappaz M, Mallet J (1987) Molecular cloning, expression and in situ hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Neurosci Lett* 73:173–180.
- Kaczmarek HJ, Kiefer SW (2000) Microinjections of dopaminergic agents in the nucleus accumbens affect ethanol consumption but not palatability. *Pharmacol Biochem Behav* 66:307–312.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527–535.
- Knapp DJ, Braun CJ, Duncan GE, Qian Y, Fernandes A, Crews FT, Breese GR (2001) Regional specificity of ethanol and NMDA action in brain revealed with FOS-like immunohistochemistry and differential routes of drug administration. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1662–1672.
- Koob GF (2004) A role for GABA mechanisms in the motivational effects of alcohol. *Biochem Pharmacol* 68:1515–1525.
- Larrieva-Sahd J (2006) Histological and cytological study of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat. II. Oval nucleus: extrinsic inputs, cell types, neuropil, and neuronal modules. *J Comp Neurol* 497:772–807.
- Luscher C, Ungless MA (2006) The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS Med* 3(11):e437.
- Marchant NJ, Densmore VS, Osborne PB (2007) Coexpression of prodynorphin and corticotrophin-releasing hormone in the rat central amygdala: evidence of two distinct endogenous opioid systems in the lateral division. *J Comp Neurol* 504:702–715.
- Marszalec W, Aistrup GL, Narahashi T (1998) Ethanol modulation of excitatory and inhibitory synaptic interactions in cultured cortical neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 22:1516–1524.
- McBride WJ (2002) Central nucleus of the amygdala and the effects of alcohol and alcohol-drinking behaviour in rodents. *Pharmacol Biochem Behav* 71:509–515.
- McCown TJ, Breese GR (1989) Mechanistic and functional divergence between thyrotropin-releasing hormone and RO 15–4513 interactions with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 13:660–663.
- Melis M, Camarini R, Ungless MA, Bonci A (2002) Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single in vivo ethanol exposure. *J Neurosci* 22:2074–2082.

- Mendez M, Leriche M, Calva JC (2001) Acute ethanol administration differentially modulates mu opioid receptors in the rat meso-acumbens and mesocortical pathways. *Brain Res Mol Brain Res* 94:148–156.
- Morales M, Criado JR, Sanna PP, Henricksen SJ, Bloom FE (1998) Acute ethanol induces c-fos immunoreactivity in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 798:333–336.
- Moriguchi S, Zhao X, Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T (2007) Effects of ethanol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 31:89–99.
- Nakagawa T, Katsuya A, Tanimoto S, Yamamoto J, Yamauchi Y, Minami M, Satoh M (2003) Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. *Neurosci Lett* 344:197–200.
- Nowak KL, McBride WJ, Lumenq L, Li TK, Murphy JM (1998) Blocking GABA(A) receptors in the anterior ventral tegmental area attenuates ethanol intake of the alcohol-preferring P rat. *Psychopharmacology* 139:108–116.
- Nowak KL, McBride WJ, Lumenq L, Li TK, Murphy JM (2000) Involvement of dopamine D2 autoreceptors in the ventral tegmental area on alcohol and saccharin intake of the alcohol-preferring P rat. *Alcohol Clin Exp Res* 24:476–483.
- Ostrander MM, Badiani A, Day HEW, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE (2003) Environmental context and drug history modulate amphetamine-induced c-fos mRNA expression in the basal ganglia, central extended amygdala, and associated limbic forebrain. *Neuroscience* 120:551–571.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Petry NM (1995) Ro 15-4513 selectively attenuates ethanol, but not sucrose, reinforced responding in a concurrent access procedure; comparison to other drugs. *Psychopharmacology* 121:192–203.
- Poulin J-F, Castonguay-Lebel Z, Laforest S, Drolet G (2008) Enkephalin co-expression with classic neurotransmitters in the amygdaloid complex of the rat. *J Comp Neurol* 506:943–959.
- Rassnick S, D'Amico E, Riley E, Koob GF (1993) GABA antagonist and benzodiazepine partial inverse agonist reduce motivated responding for ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 17:124–130.
- Rétaux S, Julien JF, Besson MJ, Penit-Soria J (1992) Expression of GAD mRNA in GABA interneurons of the rat medial frontal cortex. *Neurosci Lett* 136:67–71.
- Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR (2003) Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2053–2058.
- Roberto M, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR (2004) Increased GABA release in the central amygdala of ethanol-dependent rats. *J Neurosci* 24:10159–10166.
- Rogard M, Caboche J, Julien JF, Besson MJ (1993) The rat nucleus accumbens: two levels of complexity in the distribution of glutamic acid decarboxylase (67 kDa) and preproenkephalin messenger RNA. *Neurosci Lett* 155:81–86.
- Ryabinin AE, Criado JR, Henricksen SJ, Bloom FE, Wilson MC (1997) Differential sensitivity of Fos expression in hippocampus and other brain regions to moderate and low doses of alcohol. *Mol Psychiatry* 2:32–43.
- Ryabinin AE, Wang YM, Bachtell RK, Kinney AE, Grubb MC, Mark GP (2000) Cocaine- and alcohol-mediated expression of inducible transcription factors is blocked by pentobarbital anesthesia. *Brain Res* 877:251–261.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577–582.
- Samson HH, Tolliver GA, Pfeffer AO, Sadeghi KG, Mills FG (1987) Oral ethanol reinforcement in the rat: effect of the partial inverse benzodiazepine agonist RO15-413. *Pharmacol Biochem Behav* 27:517–519.
- Samson HH, Hodge CW, Tolliver GA, Haraguchi M (1993) Effect of dopamine agonists and antagonists on ethanol-reinforced behavior: the involvement of the nucleus accumbens. *Brain Res Bull* 30:133–141.
- Samson HH, Chappell A (2001) Muscimol injected into the medial prefrontal cortex of the rat alters ethanol self-administration. *Physiol Behav* 74:581–787.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14:1100–1109.
- Senba E, Ueyama T (1997) Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* 29:183–207.
- Smith BR, Robidoux J, Amit Z (1992) GABAergic involvement in the acquisition of voluntary ethanol intake in laboratory rats. *Alcohol Alcohol* 27:227–231.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organization in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113–135.
- Sun N, Cassell MD (1993) Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol* 330:381–404.
- Ticku MK, Kulkarni SK (1998) Molecular interactions of ethanol with GABAergic system and potential of RO15-4513 as an ethanol antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* 30:501–510.
- Tzschenke TM (2000) The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino Acids* 19:211–219.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 19:1826–1836.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Ensen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Naim AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:491–496.
- Voom P, Gerfen CR, Groenewegen HJ (1989) Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein. *J Comp Neurol* 289:189–201.
- Wilkie MB, Besheer J, Kelley SP, Kumar S, O'Buckley TK, Morrow AL, Hodge CW (2007) Acute ethanol administration rapidly increases phosphorylation of conventional protein kinase C in specific mammalian brain regions in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 7:1259–1267.
- Yakabi K, Iwabuchi H, Nakamura T, Endo K, Fukunaga Y, Kumaki I, Takayama K (2002) Neuronal expression of Fos protein in the brain after intravenous injection of gastrin in rats. *Neurosci Lett* 317:57–60.
- Zahn DS, Heimer L (1993) Specificity in the efferent projections of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell. *J Comp Neurol* 327:220–232.
- Zang L, Lou D, Jiao H, Zhang D, Wang X, Xia Y, Zhang J, Xu M (2004) Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* 24:3344–3354.
- Zhu PJ, Lovinger DM (2006) Ethanol potentiates GABAergic synaptic transmission in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J Neurophysiol* 96:433–441.