



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PARTICIPACIÓN DE LAS ENCEFALINAS EN
LOS MECANISMOS DE NEUROADAPTACIÓN AL
ALCOHOL EN LA VÍA MESOCORTICOLÍMBICA DE
LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

IRAI GUADALUPE BARBOSA LUNA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

COMITÉ TUTOR: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

PARTICIPACIÓN DE LAS ENCEFALINAS EN
LOS MECANISMOS DE NEUROADAPTACIÓN AL
ALCOHOL EN LA VÍA MESOCORTICOLÍMBICA DE
LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

IRAI GUADALUPE BARBOSA LUNA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

COMITÉ TUTOR: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **BARBOSA LUNA IRAIS GUADALUPE** con número de cuenta 508010882, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LAS ENCEFALINAS EN LOS MECANISMOS DE NEUROADAPTACIÓN AL ALCOHOL EN LA VÍA MESOCORTICOLÍMBICA DE LA RATA"**. realizada bajo la dirección de la: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH.

Presidente: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
Vocal: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Secretario: DR. JOSÉ ALFONSO FERNÁNDEZ GUASTI
Suplente: DRA. PATRICIA JUDITH DE GORTARI GALLARDO
Suplente: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de mayo de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradezco al Posgrado en Ciencia Biológicas, UNAM el permitirme realizar los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT 82728 y al Instituto de Ciencia y tecnología del Distrito Federal, ICyTDF PICDS08-13 por los apoyos económicos a la Investigación.

A los miembros de mi comité tutor, Doctora Lourdes Massieu Trigo, al Doctor Ignacio Camacho Arrollo y por supuesto a mi tutora Doctora Milagros Méndez Ubach por todo su trabajo, paciencia y enseñanzas. Gracias a los tres por sus observaciones, el tiempo que me dedicaron y los conocimientos que me transmitieron en cada examen tutorial y fuera de estos.

A la Doctora Patricia de Gortari Gallardo, al Doctor Gabriel Roldán Roldán y al Doctor Alonso Fernández Guati, por aceptar ser miembros de mi jurado de examen y por las valiosas observaciones que me hicieron al revisar el escrito.

A mi Esposo. Anaras, mi compañero, mi alegría y motivación, hasta mi enfermero. Por todo el amor que me das, y el que provocas en mí, tu paciencia, esfuerzo, detalles, todo tu apoyo y por quererme tanto. Trabajaste mucho por este título, te corresponde también. No imagino como hubiera sido este proceso sin ti, a mi lado en cada momento.

A mis padres. Mamá, por ti soy y estoy. Por todo lo que me enseñaste, el coraje y la fuerza, por tu preocupación y esfuerzo para que mis hermanas y yo nos superáramos. Lo que más me gusta de todo esto, es que independientemente de lo que pueda significarle a alguien, a ti debe llenarte de gratas emociones, sabes que también es tuyo, y a mi Papá, que donde está, sé, las comparte contigo.

A Leda, Osiris, Hugo y Ardal, por estar siempre al pendiente, su cariño, apoyo y por hacerme tía. A Sofi, Ángel y Amelie que me regalan tantos momentos tiernos y alegrías.

A Mamiuegra, Papisuegro y toda la familia Piña Ramírez, quienes me recibieron con los brazos abiertos, siempre me han impulsando y demostrando su afecto, lo que me hace afortunada.

A mis amigos y compañeros del Instituto. A Fa y Mariana, siempre pendientes y dispuestas a ayudar, más allá de lo que les haya podido pedir. Alfonso, Claus, Denisse, Gaby, Male, Marce, Martha, Nico, Noé, René, Rosi y Silvia. Su compañerismo, amistad y cariño sincero, los experimentos, las charlas, consejos, las comidas o reuniones compartidas. Doctor Miguel Asai, más que un anticuerpo, que por supuesto agradezco, no tienen precio el tiempo, los consejos, la motivación, las pláticas y los ensayos. De múltiples maneras, ustedes han contribuido a que terminara este proyecto. A mis compañeros de laboratorio por sus contribuciones en mi desarrollo.

A las Doctoras Lourdes García y Marcela Biaguini, a mis compañeras de grupo: Avi, Caro, Blanca, Lucina, Lupita, Rosalba, Katia..., por la contención, los consejos, la motivación, la empatía, su experiencia, todo lo que he aprendido con

ustedes y de ustedes en el tiempo que tengo de conocerlas. Doctores Neftalí Pérez-Xochipa, Alfredo Whaley y Alejandro Díaz, por su calidad profesional, tiempo y atenciones que aprecio mucho.

Doctor Adolfo Fuentes Alburo un placer siempre verlo y escuchar sus cálidas pláticas y Guadalupe Pérez Jauregui, gracias por sus sabias palabras, su tiempo, cariño y amistad, por todo lo que me han ayudado, ¡excelente mancuerna! Como explicarles a todos el impacto que han tenido en mi vida. Simplemente estoy aquí, así, gracias a ustedes, admiro la calidad de ser humano de ambos y siempre están presentes en mi mente y corazón. Doctora Rachel Katz, Mireya Flores y Laura Rizoano, la paciencia, el empeño y su búsqueda continua de nuevas opciones, siempre ha sido difícil pero lo hubiera sido mucho más sin su intervención y amabilidad. Tienen toda mi gratitud por su perseverancia y por no rendirse conmigo.

A Pucky, siempre al pie de la cama hasta que todo pasaba, "la razón de tu existir" te extraña y te agradece tu gran cariño y lealtad, incluso hasta el último momento. Grecko, Pelusa y Oso, después de un día difícil que mejor que su entusiasmo y cariñosa bienvenida al verme llegar cada día, incondicionalmente. Tenemos tanto que aprender de ustedes.

Como siempre, después de lograr algo difícil, miro hacia atrás sorprendida y me cuestiono cómo fue que llegue a ese punto en circunstancias tan "particulares", escribir esto lo aclara todo, son tanta gente, y cada quien ha dado de sí, de alguna forma, para iluminar mi vida, lo que contribuyó a que terminé este proyecto de la mejor manera, algunas personas somos muy complicadas y no se nos facilitan ciertas cosas, yo le agradezco a Dios, la presencia de todos ustedes (y los que olvido) en mi vida.

Sinceramente, con mucho cariño y de todo corazón, mil gracias.

A toda mi familia

Porque aún siendo mucho más importantes, les he dado tan poco y he convivido menos con ustedes, para iniciar, mantenerme y concluir este proyecto.

Como un intento de compensar mis ausencias

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas	3

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Introducción	4
Antecedentes.....	5
1. Reforzamiento y recompensa	5
1.1 Anatomía y función del circuito de reforzamiento y recompensa	6
... Figura 1. Localización cerebral de las regiones que conforman el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico.....	8
1.2 Propiedades reforzadoras del alcohol.....	8
1.3 Péptidos opioides	11
Figura 2. Secuencia peptídicas de la Met-enk y Leu-enk	11
Tabla 1. Precursores de los péptidos opioides, secuencias peptídicas y selectividad por los receptores opioides	12
1.3.1 Síntesis, procesamiento, liberación y degradación de los péptidos opioides.....	13
Figura 3. Esquema del precursor de la Pro-encefalina	14
Tabla 2. Distribución de péptidos opioides y sus receptores en el cerebro de la rata ...	15
1.3.2 Receptores opioides.....	16
Figura 4. Estructura del receptor opioide delta	18
Figura 5. Vías de señalización del receptor opioide delta	19
1.3.3 Papel de los péptidos opioides en el reforzamiento del alcohol	21
Tabla 3. Agonista y antagonistas de receptores opioides	22
Tabla 4. Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre el contenido de Met-enk en distintas regiones del cerebro de roedores	27
Justificación	29
Hipótesis.....	30
Objetivos.....	31

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Tratamiento crónico con etanol.....	32
2.2 Extracción de Met-enk de regiones cerebrales.....	32
2.3 Radioinmunoensayo de Met-enk	33
2.3.1 Marcaje de Met-enk con Na ¹²⁵ I	33
2.3.2 Purificación del trazador por filtración en gel	34
2.3.3 Determinación de la inmunoreactividad de [¹²⁵ I]-Met-enk.....	34
Tabla 5. Preparación de tubos para determinación de inmunoreactividad.....	35
2.3.4 RIA de Met-enk	36
2.3.4.1 Preparación de la curva estándar de Met-enk	36
Tabla 6. Preparación de tubos para curva estándar de Met-enk.....	36
2.3.4.2 Preparación del estándar interno	36
2.3.4.3 Tratamiento de las muestras experimentales	37
2.3.4.4 Dilución del anticuerpo E-8 contra Met-enk	37
2.3.4.5 Dilución del trazador ([¹²⁵ I] Met-enk)	37
2.3.4.6 Cuantificación de Met-enk por RIA	37
Tabla 7. Preparación de tubos para RIA de Met-enk.....	38
2.4 Determinación de proteínas	38
Tabla 8. Preparación de tubos para el ensayo de determinación de proteínas	39
2.5 Autoradiografía cuantitativa del receptor opioide delta.....	39

2.6 Determinación de la concentración de alcohol en sangre	40
2.7 Análisis estadístico	41

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Variaciones en el peso y el consumo de alimento y agua durante el tratamiento crónico	42
Figura 6. Registro del peso de los animales a lo largo del tratamiento crónico	42
Figura 7. Consumo de alimento a lo largo del tratamiento crónico	43
Figura 8. Consumo de líquidos a lo largo del tratamiento crónico.....	44
Tabla 9. Consumos promedio de líquidos durante 4 semanas de tratamiento crónico	44
3.2 Efecto del tratamiento crónico con etanol o sacarosa sobre el contenido de Met-enk en diferentes regiones del cerebro de rata	45
3.2.1 Sistema mesocorticolímbico.....	45
Figura 9. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre el contenido de Met-enk en regiones del sistema mesocorticolímbico de la rata	45
3.2.2 Vía nigroestriatal	46
Figura 10. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre el contenido de Met-enk en regiones de la vía nigroestriatal de la rata	46
3.2.3 Otras regiones.....	46
Figura 11. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre el contenido de Met-enk en el hipocampo, hipotálamo y amígdala de la rata.....	47
3.3 Efecto del tratamiento crónico con etanol o sacarosa sobre la unión de [³ H]-DPDPE al receptor opioide delta en diferentes regiones del cerebro de rata.....	48
3.3.1 Sistema mesocorticolímbico.....	48
Figura 12. Unión de [³ H]-DPDPE al receptor opioide delta en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens de ratas Wistar	48
Figura 13. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre la unión del [³ H]-DPDPE al receptor delta en regiones del sistema mesocorticolímbico de la rata	49
3.3.2 Vía nigroestriatal	50
Figura 14. Unión de [³ H]-DPDPE al receptor opioide delta en el caudado-putamen y la <i>substantia nigra</i> de ratas Wistar.....	50
Figura 15. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre [³ H]-DPDPE al receptor delta en regiones de la vía nigroestriatal de la rata	51
Figura 16. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre [³ H]-DPDPE al receptor delta en la región lateral de caudado putamen anterior-medial y medial-posterior de la rata.....	52
3.4 Niveles de etanol en plasma en animales tratados crónicamente con alcohol	52

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Discusión de resultados	53
-------------------------------	----

CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Conclusión y perspectivas.....	59
--------------------------------	----

ANEXOS

I. Reactividad cruzada del anticuerpo E-8 contra Met-enk	60
II. Preparación del estándar interno	60
III. Preparación de soluciones para la determinación de proteínas	61

REFERENCIAS	62
-------------------	----

Resumen

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico juega un papel fundamental en los mecanismos cerebrales de reforzamiento y recompensa de la mayoría de las drogas de abuso, incluido el alcohol (etanol). Numerosos estudios sugieren que los efectos reforzadores del etanol en el cerebro implican, al menos parcialmente, la activación del sistema opioide endógeno. Por otra parte, se ha postulado que la transmisión dopaminérgica en la vía nigroestriatal podría estar relacionada con los mecanismos implicados en la sensibilidad cerebral al etanol y participar en el proceso de adicción. Aunque las evidencias muestran que los opioides están implicados en el reforzamiento de etanol, el papel de estos péptidos en los procesos de dependencia a la droga no es claro. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la administración crónica de etanol sobre el contenido de Metionina-enkefalina (Met-enk), así como sobre la unión de un ligando selectivo del receptor opioide delta (δ) en diferentes regiones del sistema mesocorticolímbico y la vía nigroestriatal de la rata. Para ello, ratas Wistar macho fueron tratadas crónicamente con una solución de etanol al 10% v/v, sacarosa (solución isocalórica) o agua durante 4 semanas. Los últimos dos grupos recibieron alimento y líquido en forma pareada al grupo de etanol. Además, se añadió un grupo control de acceso libre a alimento y líquido (*ad libitum*). El contenido de Met-enk en las áreas de interés se midió por radioinmunoensayo. Las modificaciones inducidas por el etanol sobre el receptor δ se realizaron mediante autoradiografía cuantitativa de receptores, utilizando un agonista selectivo de este receptor, el [3 H] (2-D-pen,5-D-pen)-encefalina ([3 H]-DPDPE). El tratamiento crónico con etanol modificó selectivamente el contenido de Met-enk en el cerebro de la rata. El etanol incrementó en un 245.5% el contenido de Met-enk en la corteza prefrontal (Cpf) y en un 25.3% en el área tegmental ventral (VTA). Este tratamiento no modificó la concentración del péptido en el núcleo accumbens (NAcc), el caudado-putamen (CP), la substantia nigra (SN), la amígdala (Amg), el hipocampo (Hp) y el hipotálamo. En contraste, el tratamiento crónico con sacarosa aumentó 61.1% el contenido del péptido en el NAcc y 55.8% en el hipotálamo. Por otra parte, el tratamiento crónico con etanol no modificó la unión del [3 H]-DPDPE en la Cpf, el NAcc ("core" y "shell") y las regiones anterior-medial, medial-posterior y posterior el CP (CPam, CPmp y CPP). El etanol tampoco modificó la unión del ligando radioactivo en la *pars reticulata* (SNr) y la *pars*

compacta (SNc) de la SN. En contraste, el tratamiento crónico con sacarosa aumentó la unión del [³H]-DPDPE 126.4% en la Cpf y 120.2% en el CPam. Nuestros resultados indican que la exposición prolongada a alcohol y/o sacarosa induce cambios selectivos en neuronas encefalinérgicas en áreas discretas del cerebro de la rata. Los efectos observados sobre el contenido de Met-enk podrían reflejar una inhibición de la liberación del péptido, o bien, modificaciones en la expresión del RNAm que da origen al péptido maduro (i.e., la Proencefalina, Pro-enk), cambios en la estabilidad del RNAm de Pro-enk, y/o alteraciones en el procesamiento post-traducciona del precursor de la Met-enk. El resultado del tratamiento con etanol y sacarosa sobre la unión de [³H]-DPDPE al receptor δ sugiere que la exposición crónica a ambas sustancias produce cambios neuroadaptativos diferenciales que, en el caso del etanol, probablemente enmascaran los efectos iniciales (agudos) producidos por la droga. Nuestros resultados sugieren que los mecanismos neurales de reforzamiento del etanol y la sacarosa son distintos y que las áreas cerebrales implicadas son específicas.

Abreviaturas

AA.	ALKO-alcohol (ratas)
Amg.	Amígdala
ANA.	ALKO non-alcohol (ratas)
ATV.	Área tegmental ventral
β-end.	beta-endorfina
CF.	Corteza frontal
Cpf.	Corteza prefrontal
CP.	Caudado putamen
DA.	Dopamina
DHM.	Dihidromorfina
[³ H]-DAMGO.	[³ H]-[D-Ala ² ,MePhe ⁴ ,Gly-ol ⁵]
[³ H]-DPDPE.	[³ H](2-D-pen,5-D-pen)-encefalina
GABA.	Ácido γ-aminobutírico
Hp.	Hipocampo
Leu-enk.	Leucina encefalina
Met-enk.	Metionina encefalina
NAcc.	Núcleo acumbens
NMDA.	N-Metil-D-Aspartato
norBNI.	nor-binaltorfimina
NP.	Alcohol non-preferring
RIA.	Radioinmunoensayo
P.	Alcohol preferring (ratas)
POMC.	Pro-opiomelanocortina
Pro-dyn.	Pro-dinorfina
Pro-enk.	Pro-encefalina
rl CPam.	Región lateral del caudado putamen anterior medial
rl CPmp.	Región lateral del caudado putamen medial posterior
SNC.	Sistema nervioso central
SNc.	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SNr.	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El alcohol es una droga de uso legal y es un agente depresor del Sistema Nervioso Central (SNC), que tiene efectos conductuales que van desde la activación psicomotora y la euforia, hasta la sedación (Duncan y Baez, 1981; Earleywine, 1994; Gingras y Cools, 1996; Hernández y Méndez, 2006; Martin et al., 1993). La adicción al alcohol se asocia con su habilidad de actuar como reforzador positivo o negativo. Como reforzador positivo, el alcohol genera efectos de recompensa (placenteros) en el individuo. En contraste, el reforzamiento negativo se presenta cuando el individuo ingiere la droga en busca de aliviar una sensación desagradable, por ejemplo para reducir el estrés (ansiolítico), y ya instaurada la adicción, para la eliminación del síndrome de abstinencia. El consumo excesivo de alcohol puede deteriorar la salud de una persona, ya que la droga puede producir pérdida del control del comportamiento, desórdenes neurológicos y cardiovasculares, hepatitis, pancreatitis, cáncer, síndrome de alcoholismo fetal (Edwards et al., 1997; Fadda y Rossetti, 1998; Ramírez et al., 2002), así como problemas en la vida familiar y laboral.

El ciclo de uso, abuso y dependencia al alcohol sucede de manera progresiva. Comienza con el consumo agudo de la sustancia; se dan los primeros contactos y el reconocimiento de los efectos placenteros que produce en el organismo. Después de varios contactos, el individuo puede generar tolerancia (necesitar una dosis cada vez mayor para obtener el efecto inicial) y, finalmente, generar dependencia a la droga, lo que se caracteriza principalmente por el uso compulsivo y crónico de la sustancia. Si se pierde el contacto con la droga se presenta el síndrome de abstinencia, que en el caso del alcohol se compone de una serie de sensaciones desagradables que van desde temblores y alucinaciones hasta convulsiones; estos síntomas desaparecen al ingerir nuevamente alcohol, ya que el individuo necesita consumirlo para sentirse bien. En este momento se considera al individuo que lo ingiere como adicto a la droga.

Al igual que en la adicción a opiáceos y otras drogas de abuso, el alcoholismo está caracterizado por el fenómeno de tolerancia y dependencia. Sin embargo, en contraste con los opiáceos (que se unen específicamente a receptores opioides) el alcohol interactúa con

componentes de la membrana celular de una manera menos selectiva, sin tener un receptor específico, alterando la función de varios receptores de neurotransmisores y neuromoduladores así como los mecanismos de transducción de los mismos.

Antes de la ingesta de alcohol u otra droga, el cerebro se encuentra en un estado de equilibrio u homeostasis fisiológica. Con el consumo crónico de alcohol se pueden presentar cambios en algunos neurotransmisores y en su número de receptores con el fin de conseguir adaptarse (obtener una nueva homeostasis) a la condición ocasionada por la presencia continua del alcohol. En el proceso por mantener la homeostasis, múltiples sistemas fisiológicos tratan de compensar los cambios inducidos por la sustancia, estos mecanismos se desarrollan a la par principalmente en vías excitadoras e inhibitoras neuronales. Esta homeostasis, paradójicamente, también es responsable de conducir a la tolerancia y a las manifestaciones del síndrome de abstinencia, a esto se le conoce en la actualidad como neuroadaptación a una droga.

Antecedentes

1 Reforzamiento y recompensa

Las drogas de abuso ejercen sus efectos reforzadores al actuar sobre un conjunto de regiones cerebrales que están interconectadas entre sí y que recibe el nombre de sistema de reforzamiento y recompensa. El efecto de los reforzadores positivos sobre el cerebro se asocia en el circuito de recompensa a un fenómeno afectivo positivo, como el placer. Un reforzador puede ser definido operacionalmente como cualquier evento que incrementa la probabilidad de producir una respuesta en particular. Recompensa tiene una definición similar, pero con cierto matiz afectivo positivo. En el caso de una droga de abuso, el reforzamiento positivo implica que el animal ejecute una tarea para obtener una recompensa (Koob, 1992).

Se conoce la existencia de diversas sustancias naturales (agua, azúcares) que al incidir sobre las vías de recompensa muestran propiedades reforzadoras. Estas vías contribuyen a la supervivencia de los individuos al estar relacionadas con diversas actividades implicadas en el mantenimiento de la vida. Entre ellas se pueden incluir aquellas que,

como comer y beber, permiten el mantenimiento diario de los individuos, y otras que, como el comportamiento sexual (otro reforzador natural) y el maternal, están más relacionadas con la supervivencia a largo plazo. Todas estas actividades han debido dejar algún tipo de “marca” en el cerebro que sirve para que permanezca en el individuo el deseo de ingerir de nuevo ese alimento o líquido o de repetir una determinada acción. Por ejemplo, el que hoy día comamos algunos alimentos y no otros, o realicemos ciertas acciones se basa, probablemente, en que al recibir los efectos placenteros (reforzamiento positivo) o nocivos (reforzamiento negativo) que alguna de estas acciones nos produzca, adquirimos una “experiencia” sobre el tema, que servirá posteriormente para continuar con el uso o abuso de la correspondiente sustancia (alimento, líquido o en su caso una droga). Algo similar ocurre con diversos fármacos, ya que algunos de éstos, además de producir un efecto benéfico, tienen propiedades reforzadoras que contribuyen a la continuación de su uso, con lo que se convierten posteriormente en sustancias de abuso para algunos de sus consumidores.

La dependencia a una droga es un síndrome que se manifiesta por un patrón de comportamiento en el que el uso de la sustancia tiene prioridad sobre cualquier otra conducta. Es una necesidad continua y compulsiva, de tal manera que eventualmente se convierte en un trastorno crónico recurrente (Edwards et al., 1981). En cuanto a su naturaleza psíquica la dependencia a drogas de abuso se define como una condición en la cual la droga produce una sensación de satisfacción y un impulso que requiere la administración periódica o continua de la sustancia para producir placer o para evitar malestares (reforzamiento negativo) (Eddy et al., 1965).

1.1 Anatomía y función del circuito de reforzamiento y recompensa

La identificación de las áreas cerebrales que forman parte del circuito de reforzamiento se realizó en animales de laboratorio, utilizando inicialmente técnicas de auto-estimulación intracraneal. Para ello, se usaron electrodos implantados en ciertas regiones cerebrales. El animal aprende a autoadministrarse descargas eléctricas, cuando éstas le proporcionan un estímulo positivo (como un efecto placentero). Los resultados obtenidos indicaron que las zonas donde la autoestimulación se repetía más frecuentemente eran el haz

prosencefálico medial, el área tegmental ventral (ATV), el hipotálamo lateral y algunas áreas de la corteza cerebral, como la corteza prefrontal (Cpf). Todas ellas configuran el sistema de recompensa. Se sabe que este circuito se origina en el cerebro medio, en el ATV, que contiene los somas de las neuronas dopaminérgicas, que proyectan sus axones hacia zonas corticales y del sistema límbico como el núcleo accumbens (NAcc) y la amígdala (Amg) (Koob, 1992, Van Ree et al., 1999). Así, el haz prosencefálico medial juega un papel fundamental en este circuito, ya que las lesiones en el, alteran severamente la funcionalidad del sistema de recompensa.

Estas regiones están relacionadas con otras zonas cerebrales, lo que permite un amplio intercambio de información entre ellas. Así, el haz prosencefálico medial está formado por largas fibras que conectan el tubérculo olfatorio, la banda diagonal de Broca, el septum y el NAcc con el hipotálamo y el ATV. Esta última región se encuentra a su vez conectada con otras regiones del cerebro. El ATV recibe proyecciones de la corteza entorrinal, la Cpf y otras procedentes de regiones límbicas implicadas en funciones motivacionales y emocionales como la Amg y el hipotálamo lateral. Además, recibe proyecciones de áreas como el locus coeruleus y los núcleos de Rafe. (Carlson, 2010).

En este sistema de recompensa merece una mención especial el NAcc, que ha sido considerado como un transductor de información entre regiones cerebrales. Convierte señales recibidas del sistema límbico en acciones motivacionales a través de sus conexiones con el sistema motor. La actividad sobre el sistema de recompensa de algunas estructuras límbicas, como la Amg, la Cpf y el hipocampo (Hp), puede ser mediante su conexión con el NAcc. Además, la proyección al área hipotalámica lateral permite al NAcc influir sobre las secreciones neuroendócrinas (Carlson, 2010). Se considera que las proyecciones que van del ATV al NAcc y a la Cpf forman el núcleo central del circuito de reforzamiento y recompensa (sistema dopaminérgico mesocorticolímbico) (Figura 1), y que la dopamina (DA) es el neurotransmisor fundamental implicado en las propiedades reforzadoras de las drogas de abuso, aunque varios neurotransmisores y neuromoduladores participan también en el reforzamiento de sustancias de abuso (Gianoulakis, 1993; Koob G.F., 1992; Torregrossa y Kalivas, 2008; Spanagel y Weiss, 1999; Ulm et al., 1995; Van Ree et al., 1999).

Se ha postulado que el sistema de recompensa se activa por un mecanismo que es común para todos los tipos de reforzadores conocidos, tanto los naturales (alimento, agua y sexo) como las drogas de abuso. (Spanagel and Weiss, 1999). Para ello, señales procedentes de la corteza, el hipotálamo lateral y otras zonas convergen en las neuronas dopaminérgicas del ATV (Koob G.F., 1992; Van Ree et al., 1999). Numerosos estudios muestran que drogas de abuso como los psicoestimulantes (cocaína y anfetamina), la nicotina, el cannabis, la fenciclidina, los opiáceos y el alcohol aumentan la actividad dopaminérgica del sistema mesocorticolímbico (Koob, 1992; Koob et al., 1998; Spanagel y Weiss, 1999; Wise and Bozarth, 1982). Estas sustancias estimulan la liberación de DA en el NAcc, evento que se considera primordial en el reforzamiento de estas drogas y que podría ser determinante en el establecimiento de la conducta adictiva (Koob, 1992; Koob et al., 1998; Spanagel y Weiss, 1999). Sin embargo, cada tipo de droga tiene acciones específicas sobre blancos moleculares distintos en la vía mesocorticolímbica.

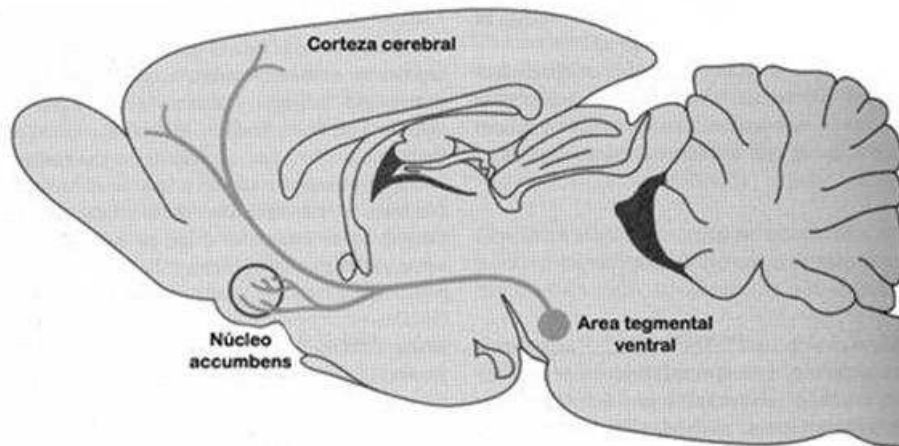


Figura 1. Localización cerebral de las regiones que conforman el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. El sistema se origina en el área tegmental ventral, que proyecta sus axones al núcleo accumbens y la corteza prefrontal. Tomado de Siegel y colaboradores (1999).

1.2 Propiedades reforzadoras del alcohol

El alcohol (etanol) es una droga de uso legal socialmente aceptada que tiene efectos bifásicos dependiendo de la dosis. A bajas dosis produce activación psicomotora y euforia, mientras que dosis altas disminuyen la actividad motora y producen sedación (Duncan y Baez, 1981; Earleywine, 1994; Gingras y Cools, 1996; Hernández y Méndez, 2006; Martín et al., 1993). Además, el alcohol en grandes cantidades genera hipotermia (Oscar-Berman,

1997) y puede producir cierto nivel de anorexia en individuos que la ingieren de manera crónica.

El consumo de alcohol en grandes cantidades, ejerce una acción depresora en el cerebro al igual que otros depresores del SNC, como los barbitúricos y las benzodiazepinas (Fadda y Rosetti, 1998). Estudios conductuales sobre el consumo de alcohol, utilizando tratamientos farmacológicos, implican a diversos neurotransmisores, como noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato, así como a varios sistemas peptidérgicos (i.e., factor liberador de corticotropina (CRF), hormona liberadora de tirotropina (TRH) y péptidos opioides) en las acciones reforzadoras del etanol (Cowen y Lawrence, 2006; Crabbe et al., 2006; Overstreet, 2002; Ulm et al., 1995).

El alcohol actúa de forma diferencial sobre las distintas áreas del sistema dopaminérgico (DAérgico) mesolímbico, aumentando la frecuencia de disparo de las neuronas DAérgicas en el ATV (Gessa et al., 1985), así como la liberación y el recambio de DA en el NAcc (Di Chiara and Imperato 1985, Fadda et al., 1989). Estudios farmacológicos usando agonistas y antagonistas de receptores de DA ha permitido conocer la participación de éstos en la conducta de consumo de etanol. En general, la administración de agonistas del receptor D₂ disminuye el consumo de etanol en varios modelos animales (McBride y Li, 1998), mientras que la de antagonistas tiene el efecto contrario (Melendez et al., 2005). Por ejemplo, la administración de un antipsicótico con propiedades de agonista parcial del receptor D₂ (aripiprazol, 6g/kg durante 5 días) disminuye el consumo de etanol al 10% en ratas “ALKO-alcohol” (AA) (que prefieren alcohol con respecto al agua) (Ingman et al., 2006). Por otra parte, la administración bilateral de un antagonista de receptores D₂ (sulpirida) en el pálido ventral aumenta el consumo de etanol en ratas “alcohol preferring” (P) (Melendez et al., 2005).

Además de las acciones sobre el circuito de reforzamiento, el alcohol tiene también otros sustratos neurales. La actividad DAérgica en la vía nigroestriatal es afectada por el alcohol, ya que se ha visto que la administración de etanol también aumenta la frecuencia de disparo en las neuronas DAérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNc) (Mereu et al., 1984) y que estimula la liberación y el metabolismo de la DA en el caudado putamen

(CP) (Fadda et al., 1989; Widdowson and Holman 1992), por lo que se ha postulado que esta vía tiene un papel crucial en la sensibilidad del cerebro al alcohol, y que podría ser un aspecto importante en el proceso de adicción (Yanai et al., 1995).

La transmisión dopaminérgica en el sistema mesocorticolímbico y la vía nigroestriatal es modulada por los péptidos opioides. Esta regulación es esencial en los procesos de reforzamiento y sensibilidad cerebral al etanol (ver más adelante, sección 1.3.3).

La exposición a etanol tiene distintos efectos en el balance de los sistemas excitadores e inhibidores en el cerebro. El GABA ha sido asociado con los efectos ansiolíticos y sedantes del alcohol (Vengeliene et al., 2008). Estudios de autoadministración indican que el etanol actúa sobre el sistema de reforzamiento a través de los receptores GABA_A, incrementando el flujo del ion cloruro, como se ha observado con los barbitúricos y las benzodiazepinas. Estas drogas ayudan al individuo a superar las situaciones conflictivas (reforzamiento negativo), lo que está relacionado con su habilidad para actuar como ansiolíticos. La exposición aguda a etanol facilita la función del receptor GABA_A (Vengeliene et al., 2008; de Witte et al., 2005), mientras que la crónica disminuye la función de este receptor, lo que puede ser resultado de una disminución en el número de receptores o por cambios en la composición de las subunidades del receptor, reduciendo su sensibilidad (Vengeliene et al., 2008; de Witte et al., 2005).

Por otro lado, la transmisión glutamatérgica ha sido relacionada al deterioro de la memoria y la falta de coordinación causada por el consumo prolongado de alcohol (Vengeliene et al., 2008). La exposición aguda a etanol ejerce un efecto inhibitorio sobre el receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato), lo que resulta en una depresión de la excitabilidad del SNC. Por otro lado, el efecto que el tratamiento crónico con esta sustancia ejerce es compensar la función glutamatérgica para restaurar la excitabilidad neuronal normal, lo que está asociado a un incremento en la función del receptor a NMDA, probablemente a nivel de las subunidades NR1 y NR2A (Tabakoff and Hoffman, 1996).

En varios casos se ha observado que el tratamiento crónico con alcohol induce modificaciones opuestas a las producidas durante la exposición aguda de la droga (Koob

and Le Moal, 2001). Un claro ejemplo de lo anterior sucede durante el síndrome de abstinencia al alcohol: algunos de los síntomas que se presentan durante este proceso están asociados a la hipofunción de los receptores GABA_A y la hiperfunción de los receptores NMDA (Esel E., 2006).

1.3 Péptidos opioides

Los opioides son sustancias semejantes al opio (“ópion”, del griego “jugo”) de la Adormidera (*Papaver somniferum*, Asia) o amapola. (Asai y Gutiérrez, 1994; Van Ree et al., 1999). El opio es un extracto de esta planta (aproximadamente el 10% de su peso) (Solomon, 1996) y probablemente ha sido usado por sus efectos psicoactivos durante más tiempo que cualquier otro agente, excepto quizás el alcohol.

En 1803, Federico Serturmer aisló y purificó un alcaloide del opio al que llamó morfina (de Morfeo, el dios griego del sueño). En 1975, Hughes y Kosterlitz reportaron la secuencia de 2 pentapéptidos, las “encefalinas” (del griego “en la cabeza”), que fueron aislados a partir del cerebro de cerdo y demostraron que actúan como agonistas de los receptores opioides. Se les llamó Metionina-encefalina y Leucina-encefalina (Met-enk y Leu-enk) y sus secuencias se muestran en la Figura 2. Estas producen una leve y transitoria analgesia después de su administración en los ventrículos cerebrales, así como por vía intraperitoneal (Vats et al., 2010).

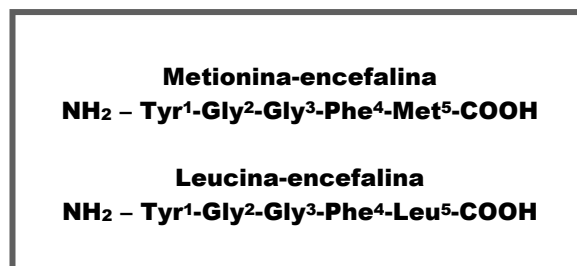


Figura 2. Secuencias peptídicas de la Met-enk y la Leu-enk.

De manera convencional, si estas sustancias son endógenas (encefalinas, endorfinas y dinorfinas) se les llama opioides, y si son de origen externo al organismo o son análogos sintéticos de estos péptidos se les llama opiáceos (entre los que se incluyen la morfina y la heroína). En humanos, los opiáceos producen euforia y un comportamiento de búsqueda de la droga. La administración a largo plazo resulta en el desarrollo de tolerancia y dependencia física. Los opioides y los opiáceos comparten propiedades como ser potentes analgésicos, entre otras características, pero sobre todo, interactúan con la misma familia de receptores, los receptores opioides. Esta familia cuenta con varios subtipos de receptores, denominados mu (μ), delta (δ) y kapa (κ). Cada péptido opioide presenta diferente selectividad por estos subtipos de receptores (Tabla 1).

Tabla 1. Precursores de los péptidos opioides, secuencias peptídicas y selectividad por los receptores opioides.

Precursor	Péptido opioide	Estructura	Selectividad por receptores
Pro-opiomelanocortina (POMC)	β -Endorfina (β -end)	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 (Pro-enk)	[Leu ⁵]Encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$\delta > \mu \gg \kappa$
	[Met ⁵]Encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	$\mu \approx \delta \gg \kappa$
	[Met ⁵]Encefalina-Arg ⁶ -Phe ⁷	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	$\mu \approx \delta \gg \kappa$
Prodinorfina (Pro-dyn)	Dinorfina A (1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gly	$\kappa \gg \mu > \delta$
	Dinorfina A (1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile	$\kappa > \delta \approx \mu$
	Dinorfina B (1-29)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Leu-Phe-Asp-Val	$\kappa > \delta \approx \mu$
	Dinorfina B (1-13)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	$\kappa > \delta \approx \mu$

La secuencia Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu y Tyr-Gly-Gly-Phe-Met son comunes para todos los péptidos opioides. Tomado de Méndez y Morales-Mulia (2008a).

Además de participar en la nocicepción, los péptidos opioides afectan diferentes funciones fisiológicas, entre ellas el apetito, la actividad del sistema inmune, las respuestas ante el estrés, la función cardiovascular y gastrointestinal, así como la regulación de la temperatura, la ingesta de alimento y agua y diversas funciones endócrinas. Además, deprimen el sistema respiratorio e incrementan la actividad locomotora, y participan en los procesos de aprendizaje. El sistema opioide endógeno puede ser activado por estrés o estímulos dolorosos, lo que resulta en la liberación de estos péptidos (Buisman-Pijlman, 2009). Además, los opioides ejercen efectos marcados en el estado de ánimo y la motivación y se les ha implicado de manera importante en los mecanismos de reforzamiento del alcohol.

1.3.1 Síntesis, procesamiento, liberación y degradación de los péptidos opioides

Los péptidos opioides se sintetizan en el soma neuronal a partir de precursores proteicos de alto peso molecular que son procesados post-traduccionamente para generar péptidos de menor tamaño con distinta actividad biológica. Los precursores son empaquetados en gránulos o vesículas de secreción electrodensas y pueden ser procesados durante el transporte axonal de las mismas hasta la terminal nerviosa (Strand, 1999). El producto final del procesamiento depende de la estructura del precursor, de la acción de algunas enzimas, y de modificaciones covalentes de algunos residuos (acetilación, amidación, fosforilación, metilación o glicosilación) (Strand, 1999). En la Tabla 1 se indican los precursores que dan origen a los péptidos opioides (encefalinas, endorfinas y dinorfinas).

La Pro-opiomelanocortina (POMC) (265 aminoácidos) es hidrolizada para formar la β -lipotropina (β -LPH, 91 aminoácidos) y la adrenocorticotropina (ACTH, 39 aminoácidos), y ésta a su vez se hidroliza para producir γ -lipotropina (58 aminoácidos) y β -endorfina (β -end, 31 aminoácidos); este último es el único péptido opioide derivado de la POMC que tiene la secuencia de la Met-enk en su extremo N-terminal (Strand, 1999).

La Pro-encefalina (Pro-enk) (236 aminoácidos) da lugar a la Met-enk y la Leu-enk (cuatro copias de Met-enk, una de Leu-enk, una de Met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ y una de Met-enk-Arg⁶-Phe⁷) (Figura 3). Además, se ha identificado un fragmento adicional de mayor tamaño que

tiene propiedades opioides. Se le conoce como péptido E y se encuentra principalmente en la médula adrenal (Strand, 1999).

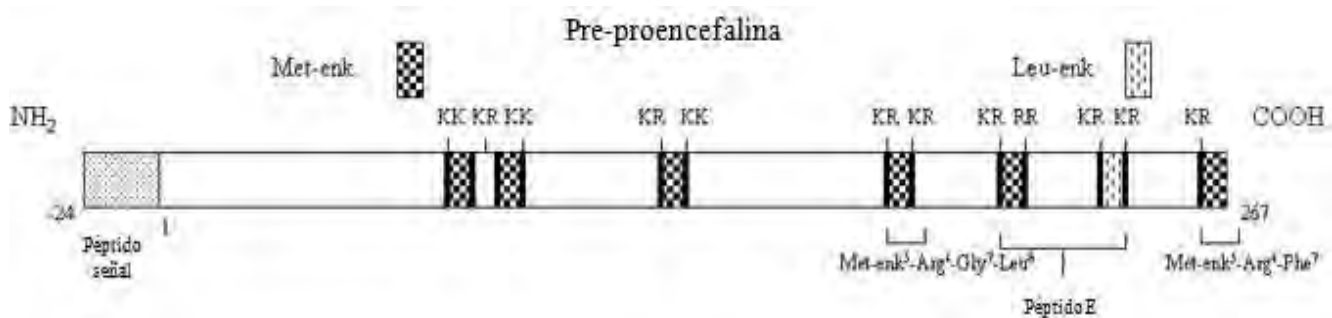


Figura 3. Esquema del precursor de la Pro-encefalina. El precursor contiene varias copias de la Met-enk y una de la Leu-enk, como se ilustra en el esquema. Los principales sitios de corte se indican con líneas sólidas y corresponden a pares de aminoácidos básicos: K=lisina, R=arginina. Tomado de Méndez y Morales-Mulia (2008c).

La Pro-dinorfina (Pro-din) (256 aminoácidos) es el precursor de diferentes formas de la dinorfina (Strand, 1999). Es hidrolizada en cinco fragmentos que contienen la secuencia de Leu-enk; algunos de éstos pueden posteriormente romperse para producir la Leu-enk. Los productos más importantes con actividad opioide se muestran en la Tabla 1.

Los opioides se encuentran distribuidos ampliamente, tanto en el cerebro como en otros órganos (i.e., tracto gastrointestinal, hígado, etc) (Strand, 1999). La β -end se sintetiza principalmente en los núcleos arcuatos del hipotálamo y el núcleo de tracto solitario (Akil et al., 1984). La mayor concentración de este péptido se encuentra en el lecho nuclear de la estría terminalis, el núcleo paraventricular (del Tálamo y el hipotálamo), el área hipotalámica lateral, el estriado, el núcleo dorsal de rafé, la sustancia gris periacueductal y la corteza entorrinal (Tabla 2). La Met-enk se distribuye heterogéneamente en el SNC. La mayor concentración del péptido se encuentra en el *globus pallidus*, el caudado putamen, el hipotálamo y el NAcc (Asai y Gutierrez, 1994, Verhoef et al., 1982) (Tabla 2). Las dinorfinas se distribuyen principalmente en el *globus pallidus*, la *substantia nigra pars reticulata* (SNr), el Hp y los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Mansour et al., 1988) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de péptidos opioides y sus receptores en el cerebro de la rata.

Región del SNC	Receptor			Péptido		
	μ	δ	κ	POMC	Pro-enk	Pro-din
I. Telencéfalo						
Corteza frontal (laminar)	+++	++	+	0	++	+
Corteza piriforme (laminar)	++	++	++	0	++	+
Corteza entorrinal (laminar)	++	++	++	0	+++	+
Núcleo central de la amígdala	0	0	++	++++	++++	++
Núcleo medial de la amígdala	+++	++	++	+++	+++	+
Núcleo lateral de la amígdala	++++	+++	+++	++	+++	+
Hipocampo (laminar)	+++	++	+	0	++	+++
Giro dentado (hipocampo) (laminar)	+++	+	+	0	++	+++
Tubérculo olfatorio	+	+++	+++	0	++	++
Núcleo accumbens	++++ ¹	++++	+++ ²	+	+++	++
Caudado putamen	++++ ¹	++++ ³	+++ ⁴	0	+++ ¹	++
Globo pálido	+	+	+	0	++++	+++
Septum medial	+++	+	+	+++	+++	0
Lecho nuclear de la estría terminalis	++	++	+++	++++	+++	++
Área preóptica	+	+	++++	+++	+++	++
II. Diencefalo						
Hipotálamo						
Núcleo supraóptico	0	0	++	0	+	+++
Núcleo paraventricular	0	0	++	++++	++++	++++
Núcleo arcuato	0	0	++	++++	+++	++
Núcleo ventromedial	0	+	+++	+	+++	++
Núcleo dorsomedial	+	0	+++	++++	++	++
Área lateral hipotalámica	+	0	++	+++	++	+++
Tálamo						
Núcleo paraventricular	0	0	+++	++++	+++	+
Núcleo central medial	++++	+	++	0	+++	0
Núcleo Reuniens	++++	+	++	0	++	0
Habénula medial	+++	+	+++	0	+++	0
III. Mesencefalo						
Núcleo interpeduncular (central)	++++	+++	+++	0	+++	0
Substantia nigra pars compacta	+++	0	0	+	++	+
Substantia nigra pars reticulata	++	+	+	0	+	++++
Área tegmental ventral	++	0	+	++	++	+
Substancia gris periacueductal (rostro-ventral)	+	0	++	++++	+++	++
Colículo superior/inferior	++++	+	++	++	+++	+
Núcleo dorsal de rafé	++	0	++	+++	++	+
IV. Puente/Médula oblongada						
Núcleo parabraquial	+++	0	++	+++	+++	++
Núcleo magno de rafé	++	0	+	+	+++	++
Núcleo reticular gigantocelular	+	0	+	++	+++	+
Núcleo del tracto solitario (caudal)	++++	+	+++	+++	+++	+++
Núcleo lateral reticular	+	0	+	+++	+++	+
Núcleo espinal del trigémino	+++	0	++	++	++++	+++
V. Médula espinal						
Substancia gelatinosa	+++	+	++	++	++++	+++

¹Parches. ² Ventral. ³ Ventrolateral. ⁴ Ventromedial.

Tomado de Mansour y colaboradores, (1988).

Los opioides se liberan al espacio sináptico en respuesta a distintos tipos de estímulos y el proceso es dependiente de calcio. Por ejemplo, el estrés aumenta la liberación de Met-enk en la médula adrenal (Strand, 1999). Los opioides son muy inestables y son rápidamente degradados por endo y exopeptidasas. La “Enkefalinasa” es capaz de hidrolizar el enlace Gly³-Phe⁴ de las enkefalinas dejando libre el tripéptido Tyr¹-Gly²-Gly³, que es el metabolito de mayor concentración de la Met-enk, además de Phe-Met; ambos fragmentos son biológicamente inactivos. Se conoce también como Endopeptidasa 24.11, Endopeptidasa neutral (NEP) o Neprilisina y dentro de la clasificación enzimática como EC 3.4.24.11. Otras endopeptidasas rompen el enlace Tyr¹-Gly², como la Aminopeptidasa N (APN) (EC 3.4.17.3). Se ha reportado la presencia de una aminopeptidasa con actividad comparable a la “Enkefalinasa”, la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (EC 3.4.15.1), formalmente llamada peptidil dipeptidasa A. Además, una carboxipeptidasa rompe el enlace Phe-Met (Asai y Gutiérrez, 1994). La NEP, APN y ACE son ectopeptidasas que se encuentran en la membrana plasmática de las células (Churchill et al., 1987; Fulcher y Kenny, 1983; Ryan et al., 1975; Solhonne et al., 1987). La actividad de estas enzimas causa una rápida hidrólisis de los péptidos opioides, cuya vida media en plasma humano es de segundos a minutos para las enkefalinas y aproximadamente cuarenta minutos para las endorfinas (Lukiw, 2006; Velasco y Álvarez, 1988).

La hidrólisis por péptidas es el mecanismo fundamental de inactivación de los opioides en el cerebro. Sin embargo, las enkefalinas son también inactivadas por mecanismos de endocitosis mediada por receptores. Por ejemplo, en neuronas estriatales de embrión de ratas Sprague-Dawley se ha observado internalización del receptor μ inducida por DAMGO (Roman-Vendrell et al., 2012).

1.3.2 Receptores opioides

Como ya se mencionó, los opioides endógenos y exógenos ejercen sus efectos a través de la activación de receptores de membrana plasmática de los tipos μ , δ y κ . Varios estudios han mostrado que la β -end tiene una alta afinidad por los receptores μ (y menor afinidad por los receptores δ), lo que sugiere que este péptido es probablemente el principal ligando endógeno del receptor μ . Igualmente, las enkefalinas, que muestran mayor afinidad por los

receptores δ , y la dinorfinas, que son más afines por el receptor κ , son considerados como los ligandos endógenos de los receptores δ y κ , respectivamente (Tabla 1) (Berman et al., 1995; Borsodi y Thoth, 1995).

Los receptores opioides se encuentran amplia y heterogéneamente distribuidos en el SNC y Periférico (Tabla 2). La expresión del receptor μ es mayor en la neocorteza, el caudado putamen (particularmente en los “parches”), el NAcc, el tálamo, el Hp, la Amg, los colículos superior e inferior en el mesencéfalo, el núcleo del tracto solitario, el núcleo espinal del trigémino y el asta dorsal de la médula espinal. Representa el 22% de los receptores opioides en el organismo. Los niveles del receptor δ son mayores en la corteza y el estriado, el NAcc y la Amg, representando el 35% del total de los receptores opioides. El receptor κ se encuentra en mayor concentración en el tubérculo olfatorio, el NAcc (ventral), el núcleo lateral de la Amg, el área preóptica, el CP (ventral medial), el núcleo del tracto solitario (caudal), el núcleo de la cama de la estría terminal, los núcleos ventromedial y dorsomedial del hipotálamo y en varios núcleos del tálamo; representa el 42% del total de receptores opioides (Mansour et al 1988; Strand, 1999).

En 1970 se demostraron los sitios de unión a opioides. Cada receptor consiste de aproximadamente 400 residuos de aminoácidos (Mansour et al., 1995) y comparten una homología en la secuencia de alrededor del 60% (Strand, 1999). Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales (I-VII) acoplados a proteínas G. Estos poseen 6 asas de conexión, de las cuales 3 son intracelulares (IL 1-3) y 3 extracelulares (EL 1-3). El sitio de unión de los ligandos del receptor μ se encuentra en la primera asa extracelular y la mitad de la región transmembranal III (TMIII). El fragmento de la TMV-VI que integra las asas extracelulares II y III (EL II y III) del receptor δ (Figura 4) representa el dominio molecular de reconocimiento de sus ligandos (Fukuda et al., 1995; Lazarus et al., 1996). Las asas citosólicas II y III, así como parte del extremo C- terminal de los receptores opioides están implicados en el reconocimiento de la proteína G. En la figura 4 se muestra la estructura del receptor δ .

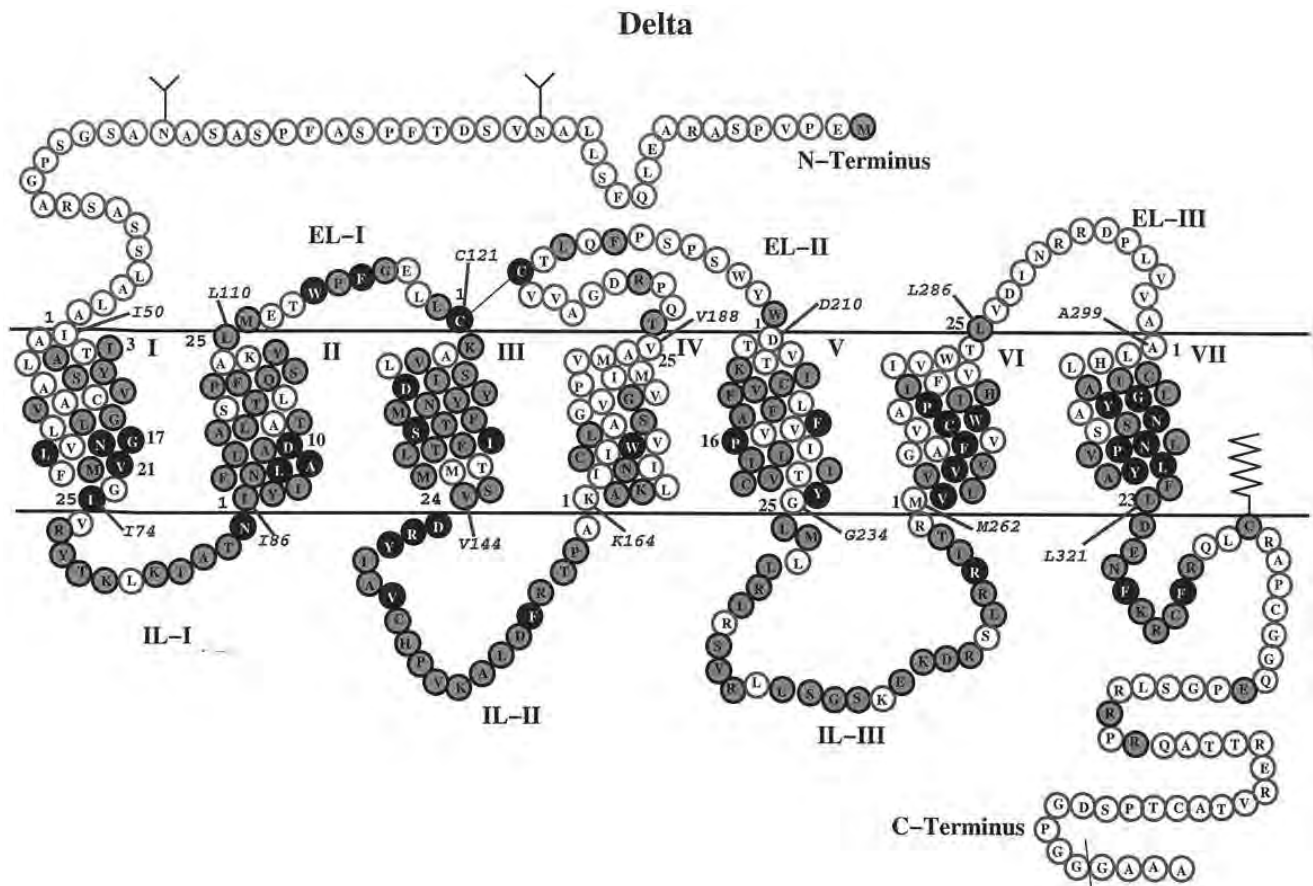


Figura 4. Estructura del receptor opioide δ Tomado de (<http://www.opioid.umn.edu/>).

La unión de opioides a sus receptores lleva a la activación de proteínas G de membrana (G_i o G_o) que transmitirán la señal a través del sistema de la adenilato ciclasa. La activación de estas proteínas G produce una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMPc, lo que ocasiona una disminución en la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y, por lo tanto, en la fosforilación de proteínas (Figura 5). La activación de los receptores opioides también disminuye la conductancia de los canales de calcio dependientes de voltaje e incrementa la corriente saliente (rectificadora) de potasio (Leff et al., 2000). Estos efectos son modulados por la PKA y la proteína cinasa C (PKC) (calcio/calmodulina dependiente). En esta vía de señalización se da la estimulación de inositol trifosfato (IP_3) después de la activación de receptores μ , y la inhibición de la hidrólisis de inositol fosfato después de la activación de receptores κ . La generación de segundos mensajeros vía el acoplamiento de receptores opioides a proteínas G_i activa la degradación de fosfatidilinositol, la cual es seguida por la

activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) (Martin-Kleiner et al., 2006).

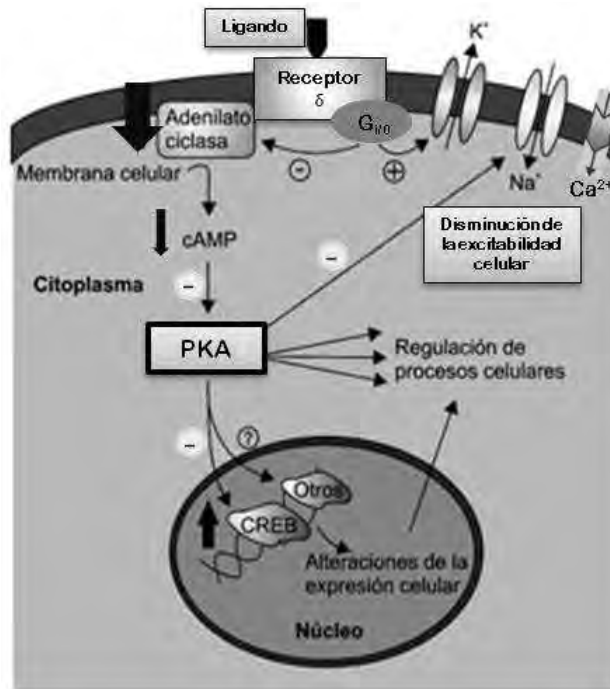


Figura 5. Vías de señalización del receptor opioide delta. cAMP=adenosin monofosfato cíclico (AMPc), PKA=proteína cinasa A, CREB=elemento de unión de respuesta a cAMP (factor de transcripción). Modificado de Nestler y colaboradores (1993).

Estudios farmacológicos han permitido caracterizar las propiedades y las funciones de los distintos tipos de receptores opioides. Estos estudios muestran que los receptores δ y μ exhiben cierta similitud, mientras que la activación de los receptores κ resulta en un espectro diferente de acciones farmacológicas. El receptor opioide μ está involucrado en el procesamiento de la información sensorial, el balance hídrico (antidiuresis), la ingesta de alimento y la función endócrina (i.e., efectos de estimulación sobre la prolactina y la ACTH e inhibición sobre la hormona luteinizante y la oxitocina), deprime la respiración y disminuye la motilidad intestinal (Holaday, 1985; Nestler et al., 2001). El receptor δ participa en la regulación del apetito, disminuye la motilidad intestinal, está involucrado en la integración de la información sensorial-motora, la función cognitiva, olfativa, cardiovascular y endócrina (i.e., efectos estimuladores sobre la hormona de crecimiento). La estimulación de los receptores μ y δ produce analgesia a nivel supraespinal y espinal, así como efectos de reforzamiento positivo de drogas de abuso como los opiáceos y el alcohol (Holaday, 1985; Nestler et al., 2001; Villarejo-Díaz et al., 2000). El receptor κ

participa en el balance hídrico (diuresis), la ingesta de alimento, la percepción del dolor a nivel espinal y la función neuroendócrina (i.e., efectos inhibidores sobre la vasopresina y la oxitocina, y efectos estimulantes sobre la prolactina). La estimulación del receptor κ produce efectos aversivos en los procesos de reforzamiento (Holaday, 1985).

Los opiáceos activan la vía dopaminérgica mesolímbica a nivel del ATV, produciéndose una liberación de DA en el NAcc. Las neuronas gabaérgicas en el ATV contienen receptores μ , cuya hiperpolarización disminuye la liberación de GABA, lo que contribuye a aumentar la actividad dopaminérgica de la vía. Así, la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico por agonistas μ y δ provoca reforzamiento positivo. En contraste, la activación de los receptores κ provoca un estado de disforia (tristeza, ansiedad, irritabilidad). Las manifestaciones neuroquímicas de estos efectos opuestos son el incremento (receptores μ y δ) y la disminución (receptor κ) de la liberación de DA en el NAcc, respectivamente. (Herz, 1998; Spanagel and Weiss, 1999).

Existe una variedad de modelos animales, incluyendo la autoadministración, la autoestimulación intracraneal y el modelo de preferencia de lugar, que han sido utilizados para investigar los efectos motivacionales de los opioides y opiáceos (Carr et al., 1989; Koob and Goeders 1989). En términos generales, estos estudios muestran que la activación de receptores μ y δ por opioides y opiáceos producen autoadministración, mientras que la del receptor κ carece de efecto. El modelo de condicionamiento de preferencia al lugar en ratas muestra que los opioides y opiáceos tienen efectos reforzadores o de aversión dependiendo del tipo de receptor con el que interactúen: los agonistas μ causan preferencia por el lugar asociado al fármaco en forma dependiente de la dosis, mientras que agonistas selectivos del receptor κ (U 50,488 y U 69593) producen aversión en el mismo modelo (Mucha and Herz, 1985). Se obtienen efectos similares cuando los péptidos opioides (administrados icv) son usados como sustancias condicionantes. La administración de β -end produce preferencia de lugar, mientras que la de E-2078 (un derivado de la dinorfina) induce aversión al lugar. El D-Pen²-D-Pen⁵-encefalina (DPDPE), agonista selectivo del receptor δ , también induce preferencia por el lugar. Por lo tanto, estos estudios sugieren que la activación de los receptores μ o δ es reforzadora, mientras que los agonistas κ inducen estados de aversión. La aversión al

lugar es causada no solo por agonistas κ , sino también por la naloxona, un antagonista no selectivo de receptores opioides (Mucha and Iversen, 1984). Se obtienen efectos similares con el uso de CTOP (antagonista selectivo del receptor μ). En contraste, la administración de ICI 174,864 (antagonista selectivo del receptor δ) o de nor-binaltorfimina (norBNI) (antagonista selectivo del receptor κ), no muestra efecto en este modelo (Herz and Spanagel, 1995). En la tabla 3 se muestran los principales agonistas y antagonistas de los receptores opioides utilizados en estudios farmacológicos.

1.3.3 Papel de los péptidos opioides en el reforzamiento de alcohol

El alcohol afecta la transmisión de diversos sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores en el cerebro, entre ellos, los sistemas endógenos de péptidos opioides. Se ha sugerido que las propiedades reforzadoras del alcohol podrían deberse a la activación del sistema opioide endógeno, lo que aumentaría el consumo de la droga (Froehlich, 1995; Herz, 1997; Ulm et al., 1995; Vangeliene et al., 2008). Numerosas evidencias apoyan este postulado (para revisión, Méndez y Cruz, 1999a; Méndez y Cruz, 1999b; Méndez y Morales-Mulia, 2008c). Por ejemplo, la administración de dosis bajas de agonistas de receptores μ y δ aumenta la preferencia y el consumo de etanol, mientras que dosis altas (morfina) (Wild and Reid, 1990), así como la de antagonistas de receptores opioides, reduce el consumo de alcohol en varios modelos, tanto en roedores y monos (Myers et al., 1986; Schaefer et al., 1988; Kornet et al., 1992), como en humanos (O'Malley et al., 1992, Volpicelli et al., 1992). Dos estudios clínicos doble ciego y placebo-controlado muestran que la naltrexona (antagonista no selectivo de receptores opioides) reduce significativamente el consumo de alcohol, la frecuencia de recaídas y la compulsión por ingerir la sustancia en pacientes alcohólicos (O'Malley et al., 1992, Volpicelli et al., 1992). Sin embargo, no todos los alcohólicos responden a la naltrexona (Fillingim et al., 2005; Ray and Hutchison, 2004) y el tratamiento prolongado con el fármaco produce tolerancia (Mann, 2004).

El papel fundamental de los receptores opioides μ y δ en las conductas de consumo de alcohol es corroborado por estudios que utilizan ratones "knockout" para receptores μ

(KO μ) y δ (KO δ). Los ratones KO μ no se autoadministran alcohol y tienen una respuesta disminuida a los efectos reforzadores de la droga (Ghozland et al., 2005, Hall et al., 2001,

Tabla 3. Agonistas y antagonistas de los receptores opioides

Tipo de receptor	Ligandos endógenos	Agonistas	Antagonistas	
			No selectivos	Selectivos
μ (μ)	β -endorfina	Morfina DAMGO	Naloxona Naltrexona Nalmefeno	CTOP CTAP TCTAP β -funaltrexamina
δ (δ)	Enkefalinas	DPDPE [DAla ²]deltorfina I y II DSBULET DADLE DALA		ICI 174864 Naltrindol Naltriben
κ (κ)	Dinorfinas	U 50488 U 69593 E 2078 U62066 CI977		Nor-binaltorfimina

DAMGO: [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-encefalina. **DPDPE:** [D-Pen², D-Pen⁵]-encefalina. **[DAla²]deltorfina I:** Tyr-DAla-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂. **[DAla²]deltorfina II:** Tyr-DAla-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂. **DSBULET:** Tyr-DSer(OtBu)-Gly-Phe-Leu-Thr. **DADLE:** D-Ala², D-Leu⁵-encefalina. **DALA:** D-Ala-Gly-Phe-Met-NH₂. **U 50488:** trans(\pm)-3,4-Dicloro-N-metil-N-(2-(1-pirrolidinil)-ciclohexil)-bencenacetamida. **U 69593:** H-Tyr-D-AllylGly-Gly-Phe-D-AllylGly-OH. **E 2078:** análogo de la dinorfina-A. **U62066:** spiradolina. **CI977:** 2-Cloro-4'-fluoroacetofenona (enadolina). **CTOP:** D-Pen-Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂. **CTAP:** D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂. **TCTAP:** DTic-DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂. **ICI174,864:** allyl2-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu-OH.

Modificado de Di Chiara y North (1992).

Roberts et al., 2000). En contraste, los ratones KO δ muestran mayor preferencia por el etanol y consumen mayores cantidades que los “wild type” (Roberts et al., 2001).

Por otra parte, el uso de líneas de roedores genéticamente seleccionados para preferir alcohol y con un alto consumo de la droga apoya la participación de los opioides en el reforzamiento de alcohol. Por ejemplo, las ratas P y AA muestran una mayor densidad del receptor opioide μ que las ratas NP (“alcohol non-preferring”) y ANA (ALKO non-alcohol) en varias regiones del cerebro como el NAcc, la Cpf, la SNr, el estriado y la Amg (de Waele et al., 1995, Gianoulakis, 1996; McBride y Li; 1998; Marinelli, 2000; Soini et al., 1999). Además, las ratas P presentan una densidad menor del receptor δ en regiones corticales y la Amg que las NP (Strother et al., 2001). Por otra parte, las ratas AA tienen niveles basales más bajos de Met-enk en el NAcc que las ratas ANA y menos Leu-enk en el ATV

que las ANA (Nylander et al., 1994). Los niveles de Met-enk también son más bajos en el hipotálamo de ratones C57BL/6 (cepa que prefiere beber alcohol), que en los DBA/2 (que evitan la ingesta de alcohol) (Blum y Briggs, 1988). Los niveles de β -end hipotalámica son mayores en ratones C57BL/6 que en los DBA/2 (Gianoulakis, 1996). Además, el contenido de RNAm de POMC (núcleo arcuato) y Pro-enk (NAcc y CP) es mayor en los ratones C57BL/6 que en los DBA/2 (Jamensky y Gianoulakis, 1999). El conjunto de estos estudios sugiere que modificaciones innatas en el sistema opioide endógeno en estos animales podrían estar relacionadas con el alto consumo de alcohol.

Numerosos estudios muestran que el alcohol afecta la transmisión de los péptidos opioides en varias regiones del cerebro (para revisión, Méndez y Cruz (1999b; Méndez y Morales-Mulia, 2008a; Méndez y Morales-Mulia, 2008b; Méndez y Morales-Mulia, 2008c). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se ha realizado en líneas de roedores seleccionados para preferir alcohol. Por ejemplo, la administración aguda de etanol (2.5 g/kg i.g.) incrementa la expresión del gen de la POMC en la pituitaria de ratas P (Froehlich, 1995). En ratones C57BL/6 se ha reportado que la administración aguda de etanol (3.0 g/kg, i.p.) aumenta el contenido de β -end en el hipotálamo (Gianoulakis y Gupta, 1986). La administración aguda de etanol (30 mM) induce una menor liberación de β -end en el hipotálamo de ratas AA que de ANA (de Waele et al., 1994). La administración de 2.5 g/kg de etanol aumenta los niveles del RNAm de Pro-enk en el NAcc de las ratas P, pero no en las NP (Li et al., 1998). Por otra parte, el tratamiento crónico con etanol reduce el RNAm de POMC en la pituitaria de ratones seleccionados para preferir alcohol (Topel, 1988). En contraste, el contenido de este RNAm en el hipotálamo, así como el contenido de β -end en el núcleo arcuato y el septum de ratones C57BL/6 incrementan después de la administración de etanol al 10% durante 30 días (de Waele y Gianoulakis, 1994). En relación al sistema encefalinérgico, los estudios reportados de exposición crónica a etanol, realizados en cepas seleccionadas por su preferencia a la droga, muestran que, en general, el resultado al término del tratamiento es una disminución en el contenido de la Met-enk (o la forma extendida de ésta) (Tabla 4). Sin embargo, algunos estudios han reportado efectos opuestos o ausencia de estos. Por ejemplo, el tratamiento por 7 días con etanol al 10% no tiene efecto sobre la expresión del RNAm de Pro-enk, aunque aumenta el contenido de Met-enk en el CP de ratones C57BL/6J (Ng et al., 1996). Nylander y

colaboradores (1994) mostraron que el tratamiento crónico con etanol al 10% por 4 semanas aumenta el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en el NAcc de ratas AA, pero no tiene efecto en el CP, el hipotálamo y el ATV (Tabla 4). Estos estudios sugieren que, además de las diferencias innatas observadas en estos animales, las respuestas a la administración de etanol en los roedores que prefieren alcohol son distintas de las observadas en los que no prefieren la droga.

En contraste con los estudios mencionados, los efectos agudos y crónicos del etanol han sido menos estudiados en roedores no seleccionados. En relación al sistema beta-endorfinérgico, la mayoría de los estudios se ha centrado en los efectos neuroendócrinos del alcohol. Por ejemplo, la administración aguda de etanol (0.5, 1.0 o 2.5 g/kg) no afecta los niveles de RNAm de POMC en el hipotálamo de ratas (Popp y Erickson, 1998). Estudios de nuestro laboratorio muestran que la administración de una dosis alta de etanol (2.5 g/kg i.g.) disminuye el contenido de β -end en el hipotálamo de ratas Wistar, sin modificarlo en el ATV, la SN, el NAcc o la Cpf (Leriche y Méndez, 2010). Por otra parte, el etanol (2.0 g/kg) aumenta la liberación de β -end en el NAcc de ratas Long-Evans (Olive et al., 2001). Dosis de 0.8, 1.6 y 2.4 g/kg de etanol (i.p.) incrementan también la liberación del péptido en el “shell”¹ del NAcc de ratas Sprague-Dawley (Marinelli et al., 2003). Además, una dosis de etanol de 2.8g/kg aumenta la liberación del péptido en el núcleo central de la Amg (Lam et al., 2008).

El tratamiento crónico con etanol produce efectos diferenciales sobre el sistema beta-endorfinérgico. La exposición continua a alcohol (que produce niveles de etanol en plasma de 120-150 mg/dl) aumenta la expresión del RNAm de la POMC en el hipotálamo de ratas Sprague-Dawley (Rasmussen et al., 1998). Tanto el grupo de Seizinger (1983) como el de Schulz (1980) encontraron que el tratamiento crónico con alcohol no afecta los niveles del precursor de la POMC. Otro estudio en ratas Sprague-Dawley mostró que el tratamiento continuo con alcohol, tal que se alcancen niveles moderados a altos en plasma (de 80 a 110 mg/dl y de 120 a 150 mg/dl) aumenta el contenido de β -end en el ATV, así como en esta región y el NAcc, respectivamente (Rasmussen et al., 1998). Además, el contenido del

¹ En el texto se refiere a “shell” como núcleo o parte central del núcleo *accumbens* y “core” como corteza del núcleo *accumbens* (NAcc “core” y “Shell”).

péptido disminuye después del tratamiento crónico con etanol (7%, 14 días) en el hipotálamo y el estriado de ratas Sprague-Dawley (Seizinger et al., 1983). En contraste con los efectos agudos del alcohol nuestro grupo mostró que el tratamiento crónico (10% durante 4 semanas) no modifica el contenido del péptido en el hipotálamo de ratas Wistar; este tratamiento tampoco modifica los niveles de β -end en el ATV, la SN, el NAcc y la Cpf (Leriché y Méndez, 2010). Finalmente, se ha reportado que los niveles de β -end en plasma disminuyen en individuos alcohólicos, lo que no ocurre con la Met-enk (Vescovi et al., 1992).

En relación con el sistema encefalinérgico, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que la administración aguda de dosis altas de etanol (2.5 g/kg) modifica la expresión del RNAm de la Pro-enk en regiones cerebrales de las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal de ratas Wistar con distintos patrones cinéticos (Méndez y Morales-Mulia, 2006; Méndez et al., 2008). Por ejemplo, el etanol aumenta la expresión de este RNAm en la Cpf, el NAcc (“core” y “shell”) y el CP, y la disminuye en la SNc, la SNr y el ATV. Además, una dosis de 2.5 g/kg de etanol disminuye el contenido de Met-enk en el NAcc y el CP de ratas Wistar (Méndez et al., 2010), aunque otros autores han reportado aumentos en los niveles del péptido en el hipotálamo, el estriado y el cerebro medio de ratas Sprague-Dawley (Seizinger et al., 1983; Schulz et al., 1980). Dosis menores de etanol (0.5 g/kg) disminuyen el contenido de Met-enk en la Cpf de ratas Wistar (Méndez et al., 2010). Asimismo, el etanol en dosis intermedias a altas (0.5-2.5 g/kg) aumenta la liberación del péptido en el NAcc de ratas Sprague-Dawley (Marinelli et al., 2005) y Wistar (Méndez et al., 2010).

Por otra parte, muy pocos trabajos han examinado los efectos crónicos del etanol en animales no seleccionados y los reportes existentes no abarcan todas las áreas del circuito de reforzamiento (Tabla 4). Por ejemplo, la exposición *in utero* a etanol al 6.6% por 6 semanas aumenta la expresión del RNAm de la Pro-enk en el “core” del NAcc de crías de 5, 12 y 19 días de edad de ratas Sprague-Dawley (Druse et al., 1999). Sin embargo, el mismo tratamiento disminuye el contenido de Met-enk en el NAcc 1 h después de la exposición a la droga (Druse et al., 1999). Una dosis reto de etanol de 2.5 g/kg en ratas Sprague-Dawley tratadas crónicamente con etanol por 5 semanas y sometidas a un

período de abstinencia de 2 semanas, disminuye el RNAm de Pro-enk en el estriado, en comparación con las ratas tratadas de forma aguda (Yang et al., 1998). Otros trabajos muestran que la exposición a etanol al 7% por 14 días o al 20% por 30 días disminuye el contenido de Met enk en el CP y el hipotálamo ratas Sprague-Dawley (Schulz et al., 1980; Seizinger et al., 1983). Además, el primero de estos tratamientos disminuye el contenido de Leu-enk en el hipotálamo y el Hp de ratas Sprague-Dawley (Seizinger et al., 1983). En la Tabla 4 se muestra un resumen de los efectos crónicos de etanol sobre el sistema encefalinérgico de roedores. Estos estudios indican, como en el caso de los roedores seleccionados para preferir alcohol, que la exposición prolongada a etanol disminuye el contenido de Met-enk en algunas regiones del cerebro de la rata.

En cuanto a los receptores opioides, se han reportado distintos efectos del etanol sobre la unión de ligandos selectivos a estos receptores, utilizando fundamentalmente membranas de tejido nervioso. Por ejemplo, la administración aguda de dosis bajas de etanol aumenta la unión de dihidromorfina (DHM) al receptor μ en membranas del cuerpo estriado de ratón C57B1, aunque dosis mayores de la droga disminuyen la afinidad del ligando a su receptor (Tabakoff y Hoffman, 1983). Sin embargo, el etanol (0.5-5%) no modifica la unión de DHM en membranas de cerebro de rata (Hiller et al., 1981). Además, el etanol (100-1000 mM o 0.1-5%) disminuye la unión de DAGO en membranas de CF de ratón C57B1 (Khatami et al., 1987) y de cerebro de rata (Bhargava et al., 1988). En el caso del receptor δ , la mayoría de los estudios muestra que la administración aguda de etanol (50-1000 mM o 0.5-5%) disminuye la unión de diferentes ligandos a este receptor en membranas de estriado (Tabakoff y Hoffman, 1983) y de CF (Khatami et al., 1987) de ratón C57B1, así como en membranas de cerebro de rata (Bhargava et al., 1988; Hiller et al., 1981). En contraste, Pfeiffer y colaboradores (1981) no encontraron efecto de una dosis de etanol de 2.5 g/kg sobre la unión de DADLE al receptor δ en membranas de estriado de rata.

Referente a la exposición crónica a etanol, los efectos reportados son diversos. Para el caso del receptor μ , el tratamiento con etanol (59.6 g/l) durante 7 días y con un período de abstinencia de 24 h disminuye la afinidad de DHM por su receptor en membranas de estriado de ratón C57B1 (Hoffman et al., 1982; Tabakoff et al., 1981), así como el número de sitios en membranas de CF cuando se utiliza DAGO como agonista (Khatami et al.,

1987). Además, el etanol (6% durante 3 semanas) disminuye la afinidad de DHM por su receptor en membranas de estriado de rata y de ratón C57B1 (Lucchi et al., 1984). Un

Tabla 4. Efecto del tratamiento crónico con etanol sobre el contenido de Met-enk en distintas regiones del cerebro de roedores.

Cepa o línea	Tratamiento	Región	Contenido del péptido	Referencias
Rata AA	10 % (4 semanas)	Núcleo accumbens	↑ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ Phe ⁷	Nylander et al. (1994)
Rata Sprage-Dawley	6.6 % (<i>in utero</i> , 6 semanas)	Núcleo accumbens	↓ Met-enk (1h)	Druse et al. (1999)
Rata AA	10% (5 semanas)	Amígdala	↓ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ -Phe ⁷	Ploj et al. (2002)
Rata Sprage-Dawley	7% (14 días)	Caudado putamen e hipotálamo	↓ Met-enk	Seizinger et al. (1983)
Rata Sprage-Dawley	20% (30 días)	Caudado putamen	↓ Met-enk	Schulz et al. (1980)
Ratón C57BL/6J	10% (7 días)	Caudado putamen	↑ Met-enk	Ng et al. (1992)
Ratón C57B110/D1	10%	Caudado putamen	↓ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ -Phe ⁷	Iukhananov et al. (1993)
Rata AA	10% (5 semanas)	Área tegmental ventral	↓ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ -Phe ⁷	Ploj et al. (2002)
Ratón C57BL/6J	10% (4 semanas)	Área tegmental ventral	↓ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ -Phe ⁷ (5 días p.t.)	Ploj et al. (2000)
Rata AA	10% (5 semanas)	Substantia nigra	↓ Met-enk ⁵ -Arg ⁶ -Phe ⁷	Ploj et al. (2002)

Modificado de Méndez y Morales-Mulia, 2008c.

tratamiento con mayor porcentaje de etanol (15% durante 3 semanas) no afecta la unión de DHM en membranas de estriado de rata (Pfeiffer et al., 1981). En el caso del receptor δ , la exposición durante 3 semanas a una solución de etanol al 15% (Pfeiffer et al., 1981) o al 6% (Lucchi et al., 1984) aumenta la afinidad de DADLE por su receptor en membranas de estriado de rata. Sin embargo, también se ha reportado que el tratamiento con etanol al 6% durante 3 semanas disminuye la afinidad de la Met-enk por el receptor δ (Lucchi et al., 1984). Estudios en ratones C57B1 muestran que el tratamiento crónico con etanol (59.6 g/l) durante 7 días y con un período de abstinencia de 24 h no tiene efecto sobre la unión de DADLE al receptor δ en membranas de CF (Khatami et al., 1987). Además, Turchan y

colaboradores (1999) encontraron que la administración de etanol (1-6%, por 30 días) disminuye la unión de [³H]-DAMGO al receptor μ en el NAcc, sin que este mismo tratamiento afectara la unión de [³H]-Ile^{5,6}deltorfina b al receptor δ .

Los efectos agudos y crónicos del etanol también se han analizado con la técnica de autoradiografía cuantitativa de receptores. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la administración de una dosis alta de etanol (2.5 g/kg) modifica selectivamente la unión de [³H]-DAMGO y [³H]-DPDPE a los receptores μ y δ en distintas áreas cerebrales de las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal de la rata, con distintos patrones cinéticos. En el caso del receptor μ , el etanol aumenta la unión de [³H]-DAMGO en la Cpf, la disminuye en el ATV, el “shell” del NAcc y la SNr y no tiene efecto en el CP (Méndez et al., 2001; Méndez et al., 2003). En contraste, el tratamiento crónico con etanol al 10% por 4 semanas no modifica la unión de [³H]-DAMGO en la Cpf, el NAcc (“core” y “shell”) y el ATV de ratas Wistar (Leriche y Méndez, 2010). Por otro lado, la administración aguda de etanol (2.5g/kg) aumenta la unión de [³H]-DPDPE al receptor δ en la Cpf, el NAcc (“core” y “shell”), la SNr y el CP de ratas Wistar (Méndez et al., 2004). El conjunto de estos estudios sugiere que los receptores opioides μ y δ muestran una sensibilidad distinta al etanol y que el efecto de la droga es región-específica.

Las discrepancias observadas entre los trabajos que han examinado los efectos agudos y crónicos del etanol sobre sistemas opioidérgicos podrían deberse a diferencias en los protocolos de tratamiento, particularmente la dosis de etanol utilizada y el tiempo de exposición a la droga, así como a la cepa o línea de roedores utilizadas para el estudio. En términos generales, se puede observar que los efectos del tratamiento agudo y crónico con etanol son opuestos.

El conjunto de datos presentados indican que los sistemas encefalinérgico y β -endorfinérgico contribuyen de manera fundamental en el reforzamiento positivo de alcohol. Además, la Met-enk y la β -end, así como los receptores δ y μ podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la dependencia a la droga.

Justificación

Como se mencionó, la propiedad del alcohol de ejercer reforzamiento positivo está relacionada con su capacidad de modificar la transmisión de los péptidos opioides. El etanol produce efectos conductuales distintos y modifica la transmisión de estos péptidos en forma diferencial, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición a la sustancia, la cepa de roedor o el ciclo luz-oscuridad (Koob G.F., 1992; Li et al., 1998; Milton et al., 1995; Hernández y Méndez, 2006). En general, las dosis bajas de alcohol estimulan la actividad motora, mientras que las dosis altas la deprimen. La administración aguda de alcohol afecta la transmisión opioidérgica en varias regiones del circuito de recompensa, y estos péptidos participan de manera importante en los mecanismos de reforzamiento de la droga (Froehlich, 1995; Herz, 1997; Ulm et al., 1995). La exposición prolongada a diversas sustancias de abuso induce cambios neuroadaptativos opuestos a los efectos agudos de la droga, que podrían estar relacionados con el establecimiento de la dependencia a las mismas (de Witte et al., 2005; Koob and Le Moal, 1997). Aunque las evidencias indican que los sistemas endógenos de péptidos opioides funcionan como mediadores de los efectos reforzadores positivos del alcohol en el cerebro, no se conoce su papel en los mecanismos de dependencia a la droga. Los estudios realizados con líneas de roedores seleccionados genéticamente para preferir alcohol y consumir cantidades elevadas de ésta sustancia sugieren que los opioides desempeñan un papel importante en el alto consumo de la droga. Sin embargo, existen pocos estudios en los que se hayan abordado estos aspectos en animales no seleccionados. Por lo tanto, nuestro interés es estudiar los cambios que se generan en los sistemas opioides cerebrales después de una exposición prolongada a alcohol, en particular en el sistema encefalinérgico (Met-enk). Estos estudios podrían contribuir a entender los mecanismos de neuroadaptación que se desencadenan ante la exposición prolongada al alcohol. Si el sistema opioide encefalinérgico participa en estos mecanismos, los cambios inducidos durante el tratamiento crónico con alcohol se podrían presentar en forma opuesta a la inducida por la exposición aguda a la droga, como se ha mostrado en otros sistemas de neurotransmisores (i.e., GABA y glutamato).

Hipótesis

1. El tratamiento crónico con etanol aumentará el contenido de Met-enk en áreas cerebrales del circuito de reforzamiento y recompensa (i.e., sistema mesocorticolímbico), así como de la vía nigroestriatal.
2. El tratamiento crónico con etanol disminuirá la unión del [³H]-DPDPE al receptor opioide δ en regiones de las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal.

Objetivo general

Estudiar los efectos del tratamiento crónico con etanol sobre la neurotransmisión de encefalinas en las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal de la rata.

Objetivos particulares

1. Estudiar los efectos de la exposición crónica al alcohol sobre el contenido de Met-enk en regiones del sistema mesocorticolímbico (ATV, NAcc, y CpF) y de la vía nigroestriatal (SN, CP) de ratas Wistar.
2. Estudiar los efectos de la exposición crónica al alcohol sobre la unión de [³H]-DPDPE al receptor opioide δ en regiones del sistema mesocorticolímbico y de la vía nigroestriatal de ratas Wistar.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1 Tratamiento crónico con etanol

Ratas Wistar macho (180-200 g) (alojadas individualmente) fueron sometidas a un ciclo de luz-oscuridad de 12 x 12 h (de 7:00 am a 7:00 pm) y recibieron alimento Purina Chow. Se formaron cuatro grupos, donde el primero recibió 100 ml de una solución de etanol al 10% (v/v) y acceso *ad libitum* de alimento diariamente. El segundo y tercer grupos recibieron sacarosa (14.14%, control isocalórico) (Whilney & Rolfes, 1996) y agua respectivamente, y fueron tratados en forma pareada con respecto al consumo de líquido y alimento (del día anterior) del grupo de etanol. El cuarto grupo recibió agua y alimento *ad libitum*. El tratamiento tuvo una duración de 4 semanas, durante el cual se registró el consumo diario de líquido y alimento, así como el incremento de peso cada tercer día. Al término del tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación, se obtuvieron los cerebros, se congelaron y se almacenaron a -70°C . Para los experimentos de cuantificación de contenido de Met-enk (n=10 por grupo), se disectaron en congelado las áreas cerebrales de interés de ambos hemisferios, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998). Para los experimentos de autoradiografía cuantitativa de receptores (n=8 por grupo), se obtuvieron cortes coronales de 20 μm a -20°C en un criostato (CM 3050, LEICA) y fueron mantenidos a -70°C hasta realizar los análisis.

Además, se obtuvieron aproximadamente 10 ml de sangre troncal de los animales para determinar la concentración de alcohol en sangre. Para separar el plasma del paquete celular, las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 30 min (Pitt, 2008). El plasma obtenido se desproteinizó con ácido tricloroacético al 6.25%.

2.2 Extracción de Met-enk de regiones cerebrales

Además de las regiones de las vías mesocorticolímbica (ATV: -5.20 a -6.80 mm de Bregma, NAcc: 2.7 a 0.48 mm de Bregma y Cpf: 5.2 a 2.7 mm de Bregma) y nigroestriatal (SN: -5.20 a -6.80 mm de Bregma y caudado-putamen anterior-medial, CPam: 0.45 a -1.60 y caudado-putamen medial-posterior, CPmp: -1.60 a -3.60 mm de Bregma), incluimos en este estudio otras áreas del cerebro (Amg: -1.6 a -5.2 mm de Bregma, hipotálamo: -1.6 a -5.2 mm de Bregma e Hp: -3.60 a -6.80 mm de Bregma), ya que como se mencionó en la

introducción, son también blanco de los efectos del alcohol. La extracción de Met-enk de las áreas cerebrales de interés se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Rasmussen y colaboradores (1998). Se añadió el volumen apropiado de ácido acético 1 N de la siguiente manera: 200 μ l (VTA), 300 μ l (SN), 400 μ l (Cpf y Amg), 500 μ l (NAcc e hipotálamo), 800 μ l (CPam y CPmp), 1000 μ l (Hp). Las muestras se hirvieron durante 20 min en baño maría y se prepararon homogenados por sonicación. Se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas totales (10% del volumen total del homogenado) y el resto se procesó para radioinmunoensayo (RIA) de Met-enk. Las alícuotas se almacenaron a -20°C. Las alícuotas para RIA se centrifugaron a 15 000 rpm (12000 g) en microfuga (Laborzentrifugen 1 K15, SIGMA) por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se evaporó a sequedad en un concentrador de muestras (Speed Vac® Plus SC110A. UV400, Thermo Savant) a temperatura ambiente. El residuo seco se mantuvo a -20°C hasta realizar el RIA.

2.3 Radioinmunoensayo de Met-enk

Para llevar a cabo el RIA de Met-enk, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

1. Marcaje de Met-enk con Na¹²⁵I, el cual se utilizó como trazador ([¹²⁵I]-Met-enk).
2. Purificación del trazador por cromatografía (filtración en gel).
3. Determinación de la inmunoreactividad de [¹²⁵I]-Met-enk.
4. RIA de Met-enk.

2.3.1 Marcaje de Met-enk con Na¹²⁵I

El marcaje de Met-enk (Peninsula Laboratories) con Na¹²⁵I (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) se llevó a cabo por el método de cloramina T (Deby-Dupont et al., 1983; Rees et al., 1971), según lo descrito por Greenwood y colaboradores (1963) y Hunter y Greenwood (1962 a,b), con algunas modificaciones. En un tubo eppendorf estéril de 500 μ l se pipetearon 25 μ l de Met-enk (stock 80 μ g/ml, en H₂O estéril) (2 μ g) y 4 μ l Na¹²⁵I (103 mCi/ml, Amersham) (400 μ Ci). La reacción se inició con la adición de 4 μ l de cloramina T (1 mg/ml, en buffer fosfatos 0.05 M, pH 7.4) (4 μ g) a temperatura ambiente. Se agitó

ligeramente, se permitió la oxidación durante 20 seg, al cabo de los cuales se detuvo la reacción por la adición de 4 μ l de metabisulfito de sodio (5 mg/ml, en buffer fosfatos 0.05 M, pH 7.4) (20 μ g). Inmediatamente después se agregaron 67 μ l de buffer fosfatos 0.05 M, pH 7.4, conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, fracción V, grado RIA) al 0.01% (1 mg/10 ml). Se agitó suavemente la mezcla de reacción y se tomaron 2 alícuotas de 2 μ l para contar la radioactividad presente antes de la purificación del trazador (determinación del porcentaje de recuperación). La mezcla de reacción se transfirió inmediatamente a una columna de filtración en gel de Sephadex G-10 (Pharmacia) previamente equilibrada. (Sephadex, Gel filtration in theory and practice, 1977).

2.3.2 Purificación del trazador por filtración en gel

Para separar el trazador obtenido ($[^{125}\text{I}]\text{-Met-enk}$) del ^{125}I libre, se equilibró la columna (30 cm) con la resina hidratada y se permitió equilibrar con el buffer de elución (buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.4, con BSA al 0.01 %) durante 12 h a temperatura ambiente a un flujo lento. Se transfirió la mezcla de reacción de iodación a la columna y se permitió su absorción en la resina. Inmediatamente se reanudó el flujo y la elución se llevó a cabo con buffer fosfatos 0.05 M, pH 7.4, conteniendo BSA 0.01%, a un flujo de 3-5 gotas/min. Se colectaron de 60 a 80 fracciones de 1 ml (aprox. 20 gotas/tubo) en tubos de poliestireno con ayuda de un colector de fracciones (Fraction Collector 2110, Biorad). Se tomó una alícuota de 5 μ l de cada fracción y se midió la radioactividad de las alícuotas en un contador gamma (Wizard Wallac 1470, Perkin Elmer) para construir el perfil cromatográfico e identificar los picos radioactivos ($[^{125}\text{I}]\text{-Met-enk}$ y el ^{125}I libre). Se guardaron las fracciones de la cromatografía a 4°C y se procedió a determinar la inmunoreactividad de las mismas.

2.3.3 Determinación de la inmunoreactividad de $[^{125}\text{I}]\text{-Met-enk}$

Una vez obtenido el perfil cromatográfico, se determinó la inmunoreactividad de algunas de las fracciones de cada uno de ellos. Para ello, se adicionaron los volúmenes necesarios y se hicieron las diluciones correspondientes con buffer RIA (buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4, NaCl 140 mM, BSA 0.01% (grado RIA) y azida de sodio (NaN_3) 0.02%) hasta obtener 10 000 cpm/tubo. El anticuerpo utilizado E-8 es una donación del Dr. Asai (Laboratorio de

Análisis Químicos, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente) y es un anticuerpo policlonal (preparado en conejo) contra la Met-enk en su forma oxidada, cuyo título es de 1/1800 (Vindrola et al., 1981; Asai et al., 1988). Sus características de reactividad cruzada se han reportado previamente (Asai et al., 1998, Rodríguez-Manzo et al., 2002) y se presentan en el anexo I. E-8 se diluyó con buffer RIA.

Para cada fracción a analizar de la cromatografía, se prepararon los tubos indicados en la Tabla 5 (por triplicado). Los parámetros a determinar en cada fracción fueron: las cpm totales (total), la unión inespecífica (en ausencia de anticuerpo) (NSB, por sus siglas en inglés “non specific binding”) y la unión total (en presencia del anticuerpo y en ausencia de Met-enk no radioactiva) (B_0).

Volúmenes (μ l)				
	Ab E-8	Buffer RIA	125 I-Met-enk	Vol. Total
Total	—	—	100	100
NSB	—	150	100	250
B_0	100	50	100	250

Tabla 5. Preparación de tubos para determinación de inmunoreactividad.

Una vez agregados los volúmenes indicados, se agitó con ayuda de un vortex. Se incubó a 4°C durante 24 h, después de lo cual el complejo antígeno-anticuerpo (excepto los tubos de los totales) se precipitó con 1 ml de etanol absoluto mantenido a -20°C. Se agitó vigorosamente con un vortex y se sometió a centrifugación (Centrífuga refrigerada Multifuge 1 L-R, Heraeus) a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se aspiró y la radioactividad en el precipitado se midió con un contador gama. Para obtener los porcentajes de inmunoreactividad, se restaron las cpm del NSB a las del B_0 y se calcularon el % de NSB/T y el % de B_0 /T de cada una de las fracciones probadas. Los valores promedio obtenidos en los ensayos de RIA donde se corrieron las muestras problema son: NSB/T= 3.7% y B_0 /T= 26.9 %. Las fracciones de [125 I]-Met-enk obtenidas con alta inmunoreactividad se almacenaron a -20°C y fueron utilizadas como trazador en el RIA de Met-enk.

2.3.4 RIA de Met-enk

El RIA de Met-enk se llevó a cabo según lo descrito por Asai y colaboradores (1988), con algunas modificaciones. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C.

2.3.4.1 Preparación de la curva estándar de Met-enk

Se preparó un estándar de Met-enk (Peninsula Laboratories) (“stock” 4µg/ml, en agua destilada estéril), el cual fue utilizado para la curva estándar.

La curva estándar de Met-enk se preparó partiendo de 100 µl/del estándar preparado, al cual se le añadieron 100 µl de H₂O₂ al 30% diluída 250 veces con agua destilada estéril [concentración final 2 ng/µl]. Después de permitir la oxidación durante al menos 18 horas a temperatura ambiente, se tomaron las alícuotas convenientes de esta solución oxidada y se prepararon diluciones seriadas para obtener las concentraciones indicadas en la Tabla 6.

Diluciones “stocks”	Met-enk (ng/100 µl)	Tubo Curva Estándar RIA
1	20	10
2	10	9
3	5	8
4	2.5	7
5	1.25	6
6	0.625	5
7	0.3125	4
8	0.15625	3
9	0.078125	2
10	0.0390625	1

Tabla 6. Preparación de tubos para curva estándar de Met-enk.

2.3.4.2 Preparación del estándar interno

Se preparó un estándar interno de Met-enk a partir de 36 estriados de rata, ya que es una región que contiene altas concentraciones del péptido (procedimiento descrito en el Anexo II). Este estándar se utilizó para corregir la variabilidad entre ensayos. Se tomó una alícuota de 100 µl del extracto total de estándar interno y se oxidó como se indicó anteriormente para la curva estándar. De esta solución oxidada se tomaron las alícuotas de 75, 50, 25, 12 y 6 µl y se procesaron a la par de las muestras en cada RIA.

2.3.4.3 Tratamiento de las muestras experimentales

El residuo seco obtenido de las áreas cerebrales de interés se resuspendió en agua destilada estéril de la siguiente manera: 200 μ l (VTA y SN), 350 μ l (Cpf y NAcc) y 500 μ l (CPam, CPmp, hipotálamo e Hp). Se centrifugó brevemente y del sobrenadante se tomaron alícuotas (100 μ l de cada región, excepto VTA y SN, que fueron de 200 μ l) y se oxidaron con 100 μ l de H₂O₂ al 30% diluída 250 veces (10 μ l para VTA y SN), como se indicó anteriormente. Terminado el tiempo de oxidación, las alícuotas de CPam, CPmp, hipotálamo e Hp fueron diluídas con 200 μ l más de agua destilada estéril. Se tomaron alícuotas de 25, 50 y 100 μ l (Cpf, NAcc, CPam, CPmp, hipotálamo e Hp), 50 y 100 μ l (Amg y SN) o 30, 60 y 80 μ l (VTA) y se sometieron a RIA de Met-enk.

2.3.4.4 Dilución del anticuerpo E-8 contra Met-enk

La dilución del anticuerpo fue la misma descrita en la sección de determinación de inmunoreactividad.

2.3.4.5 Dilución del trazador ($[^{125}I]$ Met-enk)

El trazador se diluyó de manera que al tomar 50 μ l/tubo se obtuvieran 5 000 cpm/tubo.

2.3.4.6 Cuantificación de Met-enk por RIA

Una vez preparados los tubos, la reacción se incubó a 4°C por 24 h. El complejo antígeno-anticuerpo se precipitó con 1 ml de etanol absoluto a -20°C, se agitó y se centrifugó a 3500 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se aspiró con vacío y se midió la radioactividad presente en el precipitado en un contador gama. Se construyó una gráfica de concentración de Met-enk (pg) *versus* unión (B₀/T% o B/B₀%) y se hizo una transformación Logit-Log (Rodbard and Lewald, 1970) de los datos para calcular la concentración de Met-enk presente en las muestras experimentales. El porcentaje de variabilidad intra-ensayo e inter-ensayo fue de 5.2 y 5.3, respectivamente. Los datos que se presentan se corrigieron por estándar interno.

Se trabajó a 4°C, por triplicado, de acuerdo a las especificaciones indicadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de tubos para RIA de Met-enk.

Tubo	RIA Met-enk				
	Volúmenes (µl)				
	Met-enk/control interno o muestras experimentales	Ab E-8	[¹²⁵ I]-Met-enk	Buffer RIA	Vol. Total
Total	—	—	50	—	50
NSB	—	—	50	250	300
Bo	—	100	50	150	300
Curva estándar (Tubos 1-10)	100	100	50	50	300
Estándar interno	100	100	50	50	300
Muestras	100*	100	50	50	300

* Si el volumen de la muestra es menor, completar a 100 µl con H₂O d.

2.4 Determinación de proteínas

La cuantificación de la cantidad de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Las alícuotas de los homogenados totales de las regiones cerebrales de interés se digirieron durante una noche a temperatura ambiente con NaOH 6 N (final 0.5 N). Se centrifugaron brevemente para tomar del sobrenadante las alícuotas para el ensayo: 20 y 40 µl (Cpf), 2 de 100 µl (NAcc y Amg), 15 y 30 µl (CPam y CPmp), 10 y 20 µl (Hp), 80 y 100 µl (hipotálamo) y 200 µl (VTA y SN).

Se utilizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (Sigma, fracción V) preparada a partir de una solución acuosa con una concentración de 1 mg/ml. Las concentraciones y la secuencia en la que se añadieron los reactivos se indican en la Tabla 8. La preparación de los reactivos se detalla en el anexo III.

La determinación se llevó a cabo a 700 nm en un espectrofotómetro (Biomate 3, Thermo Electron Corporation). La curva estándar en presencia de NaOH tiene un comportamiento similar a una curva en ausencia de dicho reactivo.

Tabla 8. Preparación de tubos para el ensayo de determinación de proteínas.

Tubo	BSA		H ₂ O μl	NaOH 0.5 N μl	React. de Cobre ml	Tiempo de reacción	Folin 1:1 μl	Tiempo de reacción
	μg	μl						
1	0.0	0.0	150.0	50.0	1.0	Agitar y dejar reposar durante 15 min	100.0	Agitar y dejar reposar durante 30 min
2	5.0	5.0	145.0	50.0	1.0		100.0	
3	10.0	10.0	140.0	50.0	1.0		100.0	
4	15.0	15.0	135.0	50.0	1.0		100.0	
5	20.0	20.0	130.0	50.0	1.0		100.0	
6	40.0	40.0	110.0	50.0	1.0		100.0	
7	60.0	60.0	90.0	50.0	1.0		100.0	
8	80.0	80.0	70.0	50.0	1.0		100.0	
9	100.0	100.0	50.0	50.0	1.0		100.0	

Volumen total en los tubos: 1.3 ml

2.5 Autoradiografía cuantitativa de receptor opioide delta

Los efectos de la administración crónica de etanol sobre el receptor opioide delta (δ) se estudiaron mediante autoradiografía cuantitativa de receptores, analizando la unión de un ligando selectivo de este receptor, la [³H] (D-Pen2-D-Pen5-encefalina) (³H-DPDPE), a secciones de cerebro de rata (Méndez et al., 2001, 2003 y 2004).

Las secciones de cerebro fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y mantenidas a -70°C. Las secciones se llevaron gradualmente a temperatura ambiente (de -70°C a -20°C, 2 h; de -20°C a 4°C, 2 h; de 4°C a temperatura ambiente, 5 min). Se eliminó el exceso de agua de los portaobjetos con papel filtro y se construyó una “cámara” haciendo un anillo alrededor de las secciones con pegamento tipo Elmers. Se dejó secar. Las secciones se preincubaron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (500 μl/“cámara”), a 25°C por 30 min y posteriormente se incubaron en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, conteniendo 8 nM [³H]-DPDPE (36 Ci/mmol, NEN-DuPont) (250 μl/laminilla) a 4°C por 1 h en cámara húmeda (Unión total). En una serie paralela de secciones se determinó la unión inespecífica, utilizando 10 μM de naloxona (antagonista de los receptores opioides). Al término de la incubación, se lavaron las secciones con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, a 4°C (6 veces, 20 seg cada uno) en cajas Copling horizontales y se secaron inmediatamente con una corriente ligera de aire frío. Las secciones se colocaron en cassettes de autoradiografía en presencia de estándares de tritio (ARC) (ART-123) y en aposición con un film sensible a

tritio (Amersham Hyperfilm-³H). Las secciones se expusieron durante 14-16 semanas a temperatura ambiente y en oscuridad.

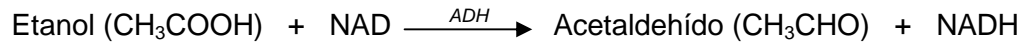
Una vez terminado el período de exposición, los films se procesaron con revelador y fijador (D-19 y “Rapid Fixer” respectivamente, ambos de Kodak) a 20°C. Se lavaron en agua corriente y finalmente se secaron a temperatura ambiente.

La cuantificación de los autoradiogramas se llevó a cabo por densitometría, utilizando un sistema computarizado para el análisis de imágenes (Image-Pro[®] Plus. Version 4.1 for Windows. Media Cybernetics). Para cada estructura cerebral, se registraron aproximadamente 5 lecturas de densidad óptica de al menos 8 secciones del cerebro de cada animal, y se promediaron. Las lecturas de densidad óptica se convirtieron a fmol/mg de tejido, haciendo referencia a los estándares de tritio y teniendo en cuenta la actividad específica del ligando radioactivo utilizado. Con estas lecturas se construyó una curva estándar, se realizó una regresión lineal y los valores de densidad óptica de las áreas cerebrales se interpolaron en la curva.

2.6 Determinación de la concentración de alcohol en sangre

La determinación del contenido de alcohol se llevó a cabo mediante la modificación del método enzimático de la *alcohol deshidrogenasa* reportado por Bucher and Redetzki (1951). Este método se basa en la reacción de oxidación de etanol a acetaldehído catalizada por la *alcohol deshidrogenasa* (ADH) en presencia de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), con el resultante incremento en la absorbancia a 340 nm. El aumento en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de alcohol en la muestra (en mg/dl). 300 µl de plasma se desproteinizaron con 400 µl de ácido tricloroacético, se agitó y permitió reposar por 4 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se construyó una curva estándar de etanol (5-320 mg/dL), en la que se interpolaron los resultados obtenidos a partir de 10 µl de las muestras de plasma de los animales tratados, a los que se le agregó 100 µl de NAD, 100 µl de ADH y 2.7 ml de buffer de glicina-hidrazina.

Se determinó la absorbancia de las muestras y la curva patrón 35 minutos después del inicio de reacción (Bucher and Redetzki, 1951; Poklis and Mackell, 1982).



2.7 Análisis estadístico

Para determinar los efectos del alcohol sobre el contenido de Met-enk y la unión del ligando radioactivo al receptor opioide delta se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba *post hoc* de Tukey-HSD, utilizando el programa SigmaStat (SigmaPlot 11.0). El valor de la significancia utilizada en este trabajo fue de $p < 0.05$.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Variaciones en el peso y el consumo de alimento y agua durante el tratamiento crónico

El incremento en peso, así como el consumo de alimento y líquido en los animales tratados crónicamente durante 30 días fue registrado a lo largo del experimento. El peso de los animales incrementó progresivamente a lo largo del tratamiento (Figura 6). Aunque los animales del grupo *ad libitum* iniciaron con un peso menor al de los otros grupos, al final del tratamiento el incremento en peso en éste fue mayor que en el grupo de etanol y que el de los grupos pareados de sacarosa y agua (Figura 6, inserto). Los grupos de etanol y sacarosa mostraron un incremento similar en peso, mientras que el de agua pareado al de etanol mostró el menor incremento en peso (Figura 6, inserto). Esto puede deberse a la restricción calórica de estos animales en comparación con los de etanol y/o sacarosa.

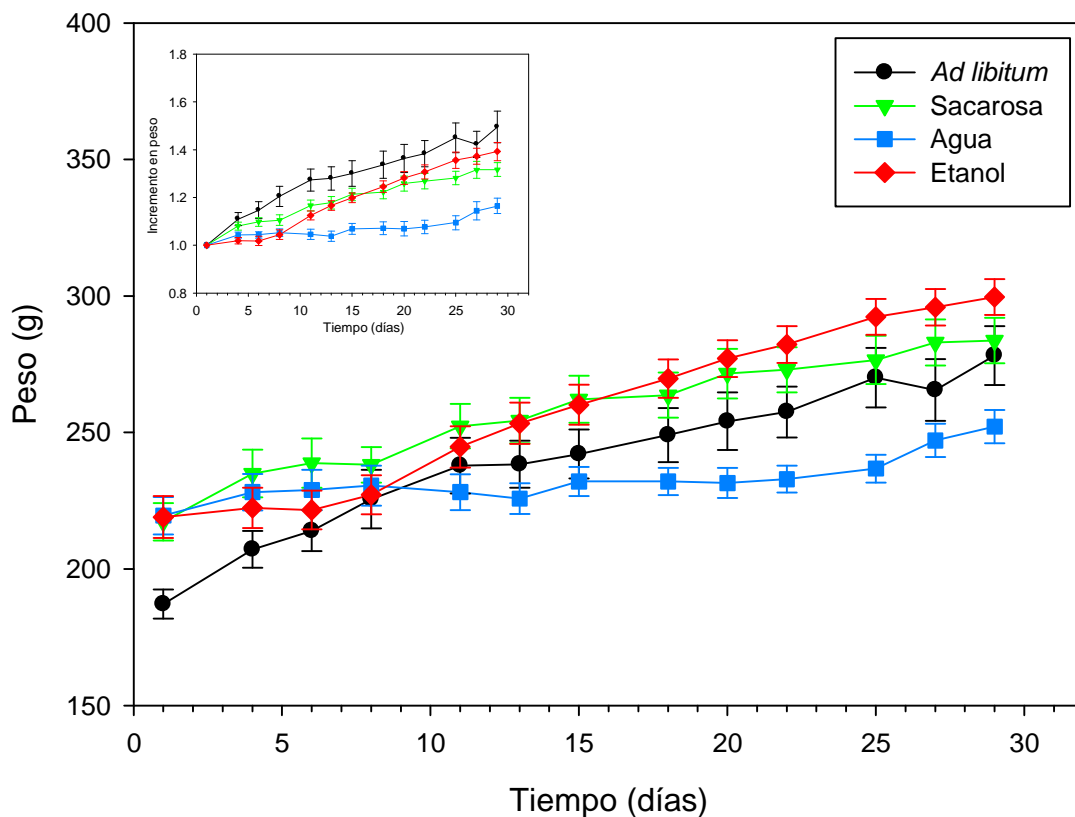


Figura 6. Registro del peso de los animales a lo largo del tratamiento crónico. Inserto: incremento en peso calculado con respecto a su peso inicial. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 10 ratas.

El incremento en el consumo de alimento fue moderado a lo largo del tratamiento (Figura 7). Los animales del grupo *ad libitum* mostraron un mayor consumo de alimento, mientras que la ingesta en el resto de los grupos fue similar. Por otra parte, el patrón de consumo de líquidos muestra que la ingesta aumentó progresivamente a lo largo del tratamiento en todos los grupos, observándose el mayor consumo en el grupo *ad libitum* (Figura 8). El consumo de líquidos en los grupos de sacarosa y agua fue semejante al del grupo de etanol. Cabe recordar que los grupos de sacarosa y agua fueron pareados al grupo de etanol (líquido y alimento restringidos). La ingesta calórica en los grupos de etanol y sacarosa fue equivalente a lo largo del tratamiento (Tabla 9). Este perfil de consumo de líquidos es similar al previamente observado en nuestro laboratorio (Leriche y Méndez, 2010).

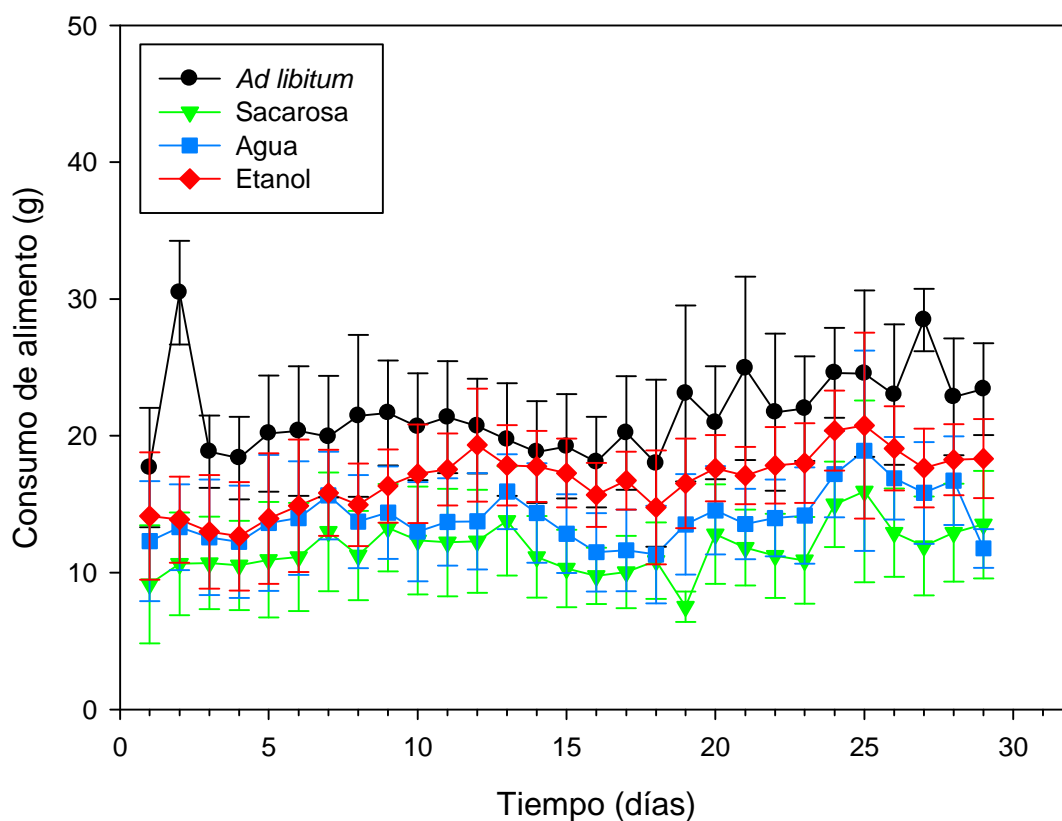


Figura 7. Consumo de alimento a lo largo del tratamiento crónico. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 10 ratas.

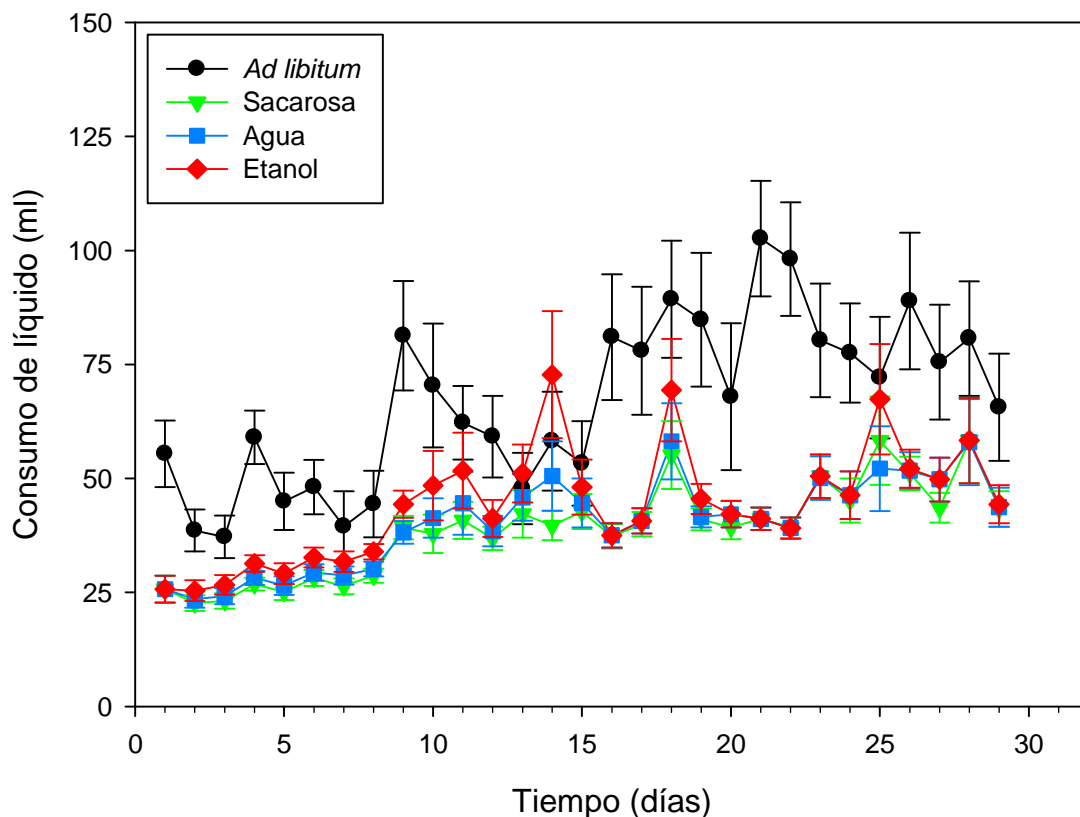


Figura 8. Consumo de líquidos a lo largo del tratamiento crónico. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 10 ratas.

Tabla 9. Consumo promedio de líquidos durante 4 semanas de tratamiento crónico.

Semana	Grupo etanol				Grupo sacarosa			
	ml	Etanol (g)	(g/kg)	Kcal	ml	Sacarosa (g)	(g/kg)	Kcal
1	25	2.0	9.0	14.1	29	4.1	18.0	16.4
2	38	3.0	12.0	21.0	49	6.9	28.0	27.7
3	42	3.4	12.5	23.5	46	6.6	24.5	26.3
4	48	3.8	13.0	26.8	51	7.2	26.0	28.8

Se muestra el consumo de líquidos promedio por semana para los grupos de etanol y sacarosa (ml), la ingesta de etanol y sacarosa promedio (g), la dosis de etanol o sacarosa (g/kg) y el equivalente calórico en ambos grupos (Kcal).

3.2 Efecto del tratamiento crónico con etanol o sacarosa sobre el contenido de Met-enk en diferentes regiones del cerebro de la rata.

3.2.1 Sistema mesocorticolímbico

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) mostró un efecto significativo del tratamiento sobre la concentración de Met-enk en el ATV ($F_{(3,33)}=7.472$, $p<0.001$), la Cpf, ($F_{(3,36)}=7.403$, $p<0.001$) y el NAcc ($F_{(3,31)}=4.943$, $p<0.006$). El tratamiento crónico con etanol aumentó 25.3% el contenido de Met-enk en el ATV y 245.5% en la Cpf con respecto al grupo *ad libitum* (Figura 9). Por otra parte, el tratamiento crónico con sacarosa aumentó el contenido del péptido en un 61.1% en el NAcc versus el grupo *ad libitum* (Figura 9).

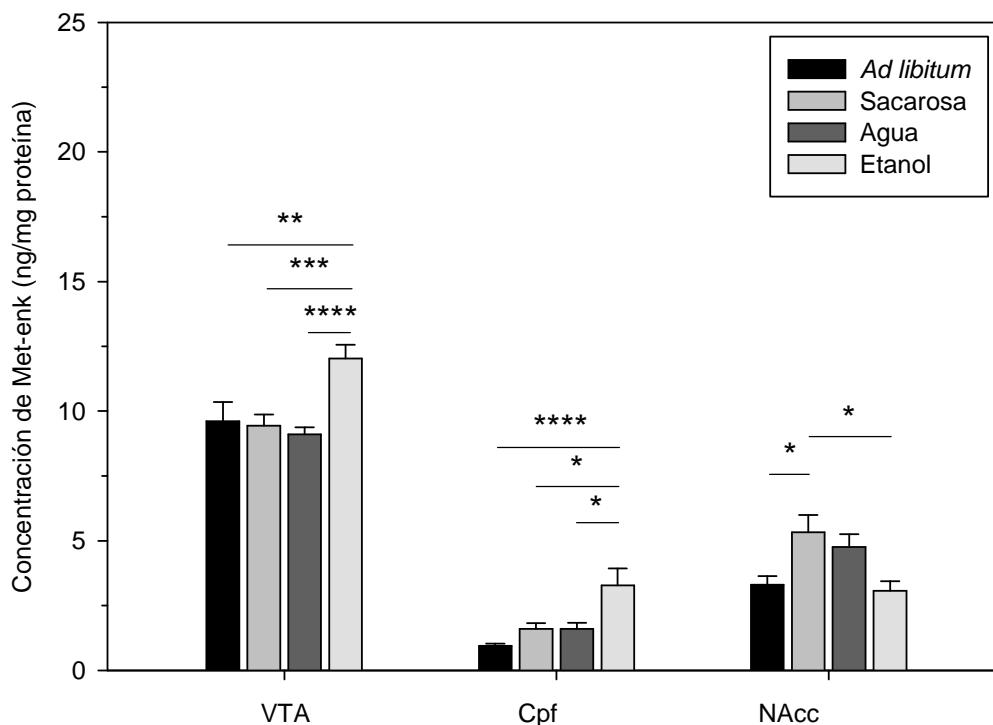


Figura 9. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre el contenido de Met-enk en regiones del sistema mesocorticolímbico de la rata. Los animales fueron tratados crónicamente con etanol 10%, sacarosa o agua, o bien mantenidos *ad libitum* por 4 semanas. El contenido de Met-enk en las regiones fue cuantificado por RIA. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM del número de animales indicado. VTA=área tegmental ventral: n=8, *ad libitum*; n=10, sacarosa; n=10, agua y n=9, etanol. Cpf=corteza prefrontal: n=10, cada grupo. NAcc=núcleo accumbens: n=9, *ad libitum*, sacarosa y agua; n=8, etanol. En la VTA y la Cpf se encontraron además diferencias significativas entre el grupo de etanol y los grupos de sacarosa y agua pareados, mientras que en el NAcc el grupo de sacarosa mostró diferencias significativas con respecto al grupo de etanol. **** $p<0.001$, *** $p<0.003$, ** $p<0.010$, * $p<0.030$.

3.2.2 Vía nigroestriatal

El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tratamiento en la SN ($F_{(3,32)}=3.073$, $p<0.042$). Sin embargo, el tratamiento crónico con etanol o sacarosa no modificó el contenido de Met-enk en esta región (Figura 10). En contraste, obtuvimos una diferencia entre los grupos de sacarosa y agua pareados. Por otra parte, el tratamiento crónico con etanol o sacarosa no tuvo efecto sobre el contenido del péptido en el CPam y el CPmp (Figura 10).

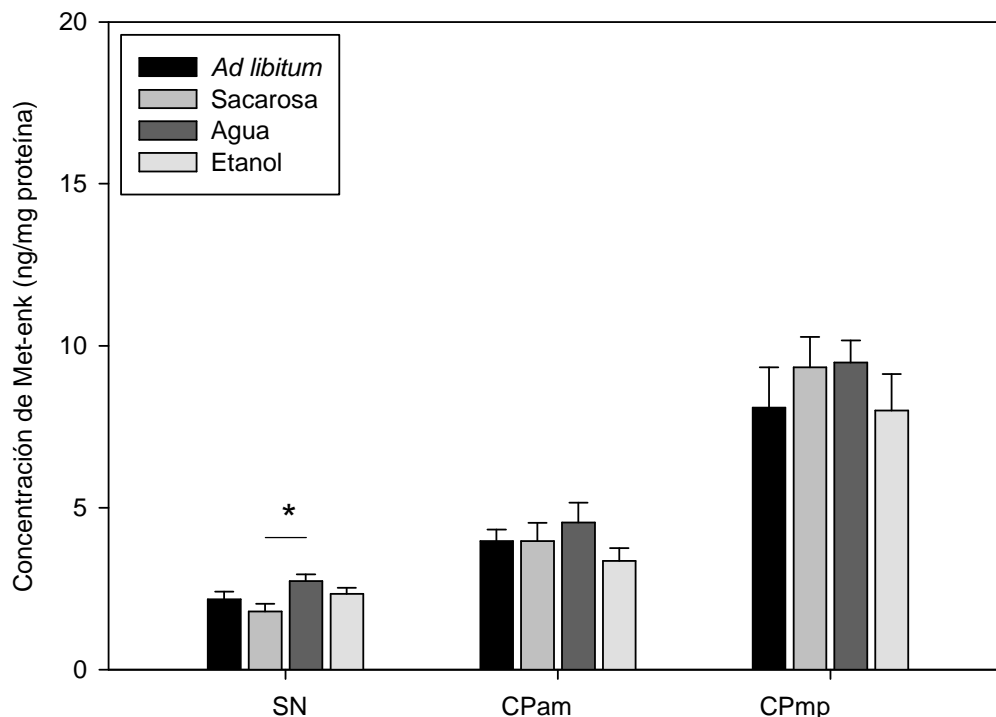


Figura 10. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre el contenido de Met-enk en regiones de la vía nigroestriatal de la rata. Los animales fueron tratados como se indica en la Figura 9. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM del número de animales indicado. SN=*substantia nigra*: n=8, *ad libitum*; n=10, sacarosa; n=8, agua y n=10, etanol. CPam=caudado putamen anterior-medial: n=9, *ad libitum*; n=8, sacarosa, agua y etanol. CPmp=caudado putamen medial-posterior: n=9, *ad libitum*; n=8, sacarosa, agua y etanol. En la SN, se encontraron diferencias significativas entre los grupos de sacarosa y agua pareados. * $p<0.027$.

3.2.3 Otras regiones

Además, se incluyó también en el estudio al Hp, el hipotálamo y la Amg, ya que se ha visto que estas áreas pueden ser afectadas por el uso de drogas de abuso como el alcohol (de Waele et al., 1992; Lam et al., 2008; Leriche y Méndez, 2010; Saland et al., 2004; Sarkar et al., 2007). El tratamiento crónico con etanol o sacarosa no modificó el contenido de Met-enk en el Hp y la Amg (Figura 11 A y C). En contraste, el análisis estadístico reveló un

efecto significativo del tratamiento en el hipotálamo ($F_{(3,33)}=4.425$, $p<0.010$). El tratamiento con sacarosa aumento 55.8% el contenido del péptido en esta región (Figura 11 B).

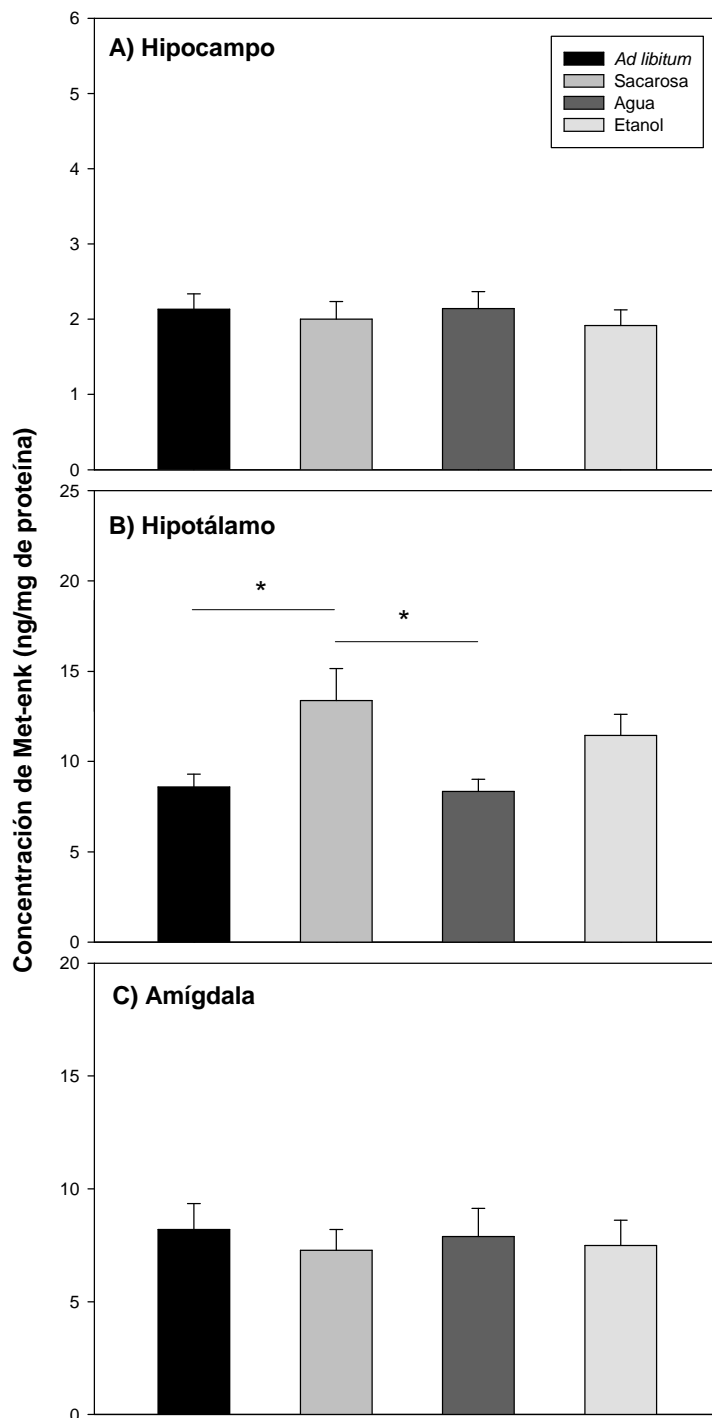


Figura 11. Efecto del tratamiento crónico con etanol o sacarosa en contenido de Met-enk en el hipocampo, el hipotálamo y la amígdala de la rata. Los animales fueron tratados como se indica en la Figura 9. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM del número de animales indicado. Hipocampo (Hp): $n=10$ cada grupo; Hipotálamo: $n=9$, *ad libitum*, sacarosa y etanol; $n=10$, agua. Amígdala (Amg): $n=10$, *ad libitum*, sacarosa y agua; $n=9$, etanol. En el hipotálamo, se encontró también una diferencia significativa entre los grupos de sacarosa y agua pareados ($p<0.018$). * $p<0.031$ versus *ad libitum*.

3.3 Efecto del tratamiento crónico con etanol o sacarosa sobre la unión de ^3H -DPDPE al receptor delta en diferentes regiones del cerebro de rata

3.3.1 Sistema mesocorticolímbico

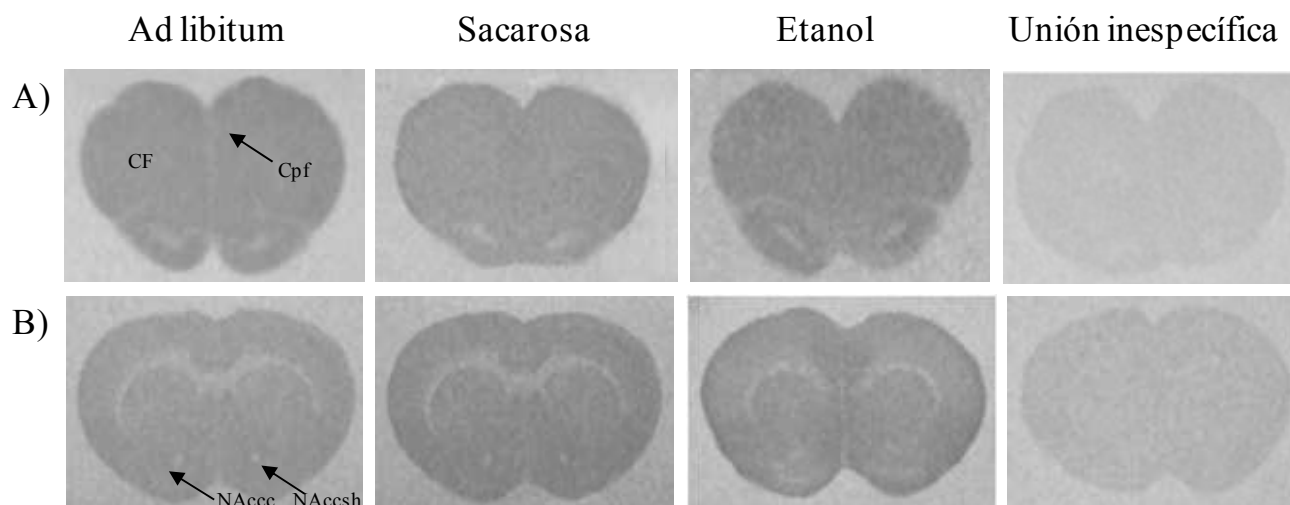


Figura 12. Unión de ^3H -DPDPE al receptor opioide delta en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens de ratas Wistar. Los animales fueron tratados crónicamente con etanol al 10% o sacarosa, o mantenidas *ad libitum* durante 4 semanas. Los experimentos de unión de ^3H -DPDPE se realizaron en cortes coronales de los cerebros de los animales y los análisis se llevaron a cabo por densitometría. La unión inespecífica se determinó en cortes paralelos en presencia de $10\ \mu\text{M}$ de naloxona. **A)** Corteza frontal (CF) y prefrontal (Cpf). **B)** Núcleo accumbens “core” (NAcc) y núcleo accumbens “shell” (NAccsh).

El ANOVA mostró un efecto significativo del tratamiento en la Cpf ($F_{(3,21)}=4.394$, $p<0.015$). En esta región, la exposición crónica a etanol no tuvo efecto. Sin embargo, el tratamiento con sacarosa aumentó 126.4% la unión del ^3H -DPDPE (Figura 13). El análisis estadístico realizado en la corteza frontal (CF) mostró resultados similares a los obtenidos en la Cpf ($F_{(3,21)}=4.037$, $p<0.021$), donde el tratamiento crónico con etanol no modificó la unión de ^3H -DPDPE, pero el de sacarosa aumentó 122% la unión del ligando al receptor δ , versus el grupo *ad libitum* ($p<0.019$). Los valores de unión de ^3H -DPDPE al receptor (en fmol ligando unido/mg de tejido) fueron los siguientes: 38.9 ± 9.9 (*ad libitum*, $n=6$), 86.3 ± 16.2 (sacarosa, $n=6$), 68.8 ± 3.4 (agua, $n=6$), 51.8 ± 7.4 (etanol, $n=7$). En el NAcc, el tratamiento crónico con etanol o sacarosa no modificó la unión del ^3H -DPDPE ni en el “core” ni en el “shell” (Figura 13). Sin embargo, observamos que la sacarosa tiende a aumentar la unión

del ligando al receptor δ , en ambas subregiones del NAcc. Estos resultados se corroborarán en estudios posteriores.

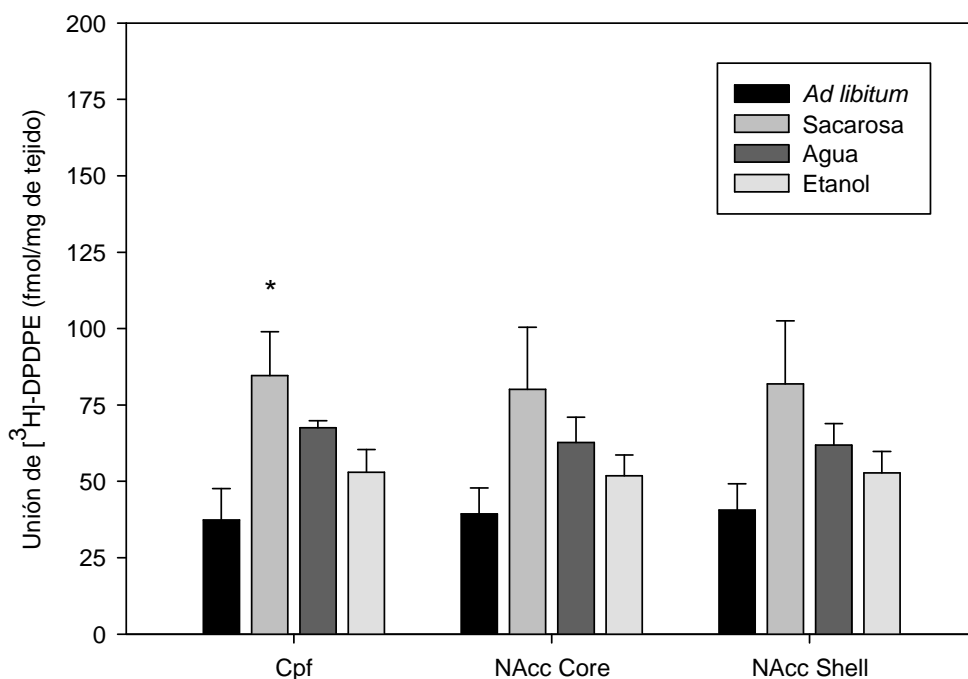


Figura 13. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre la unión del $[^3\text{H}]$ -DPDPE al receptor delta en regiones del sistema mesocorticolímbico de la rata. Los animales fueron tratados crónicamente con etanol 10%, sacarosa o agua, o bien mantenidos *ad libitum* por 4 semanas. La unión de $[^3\text{H}]$ -DPDPE al receptor delta fue determinada por autoradiografía cuantitativa de receptores. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM del número de animales indicado. Cpf: n=6, *ad libitum*, sacarosa y agua; n=7, etanol. NAcc core y NAcc Shell: n=6, *ad libitum*, agua y etanol; n=5, sacarosa. * $p < 0.012$ versus *ad libitum*.

3.3.2 Vía nigroestriatal

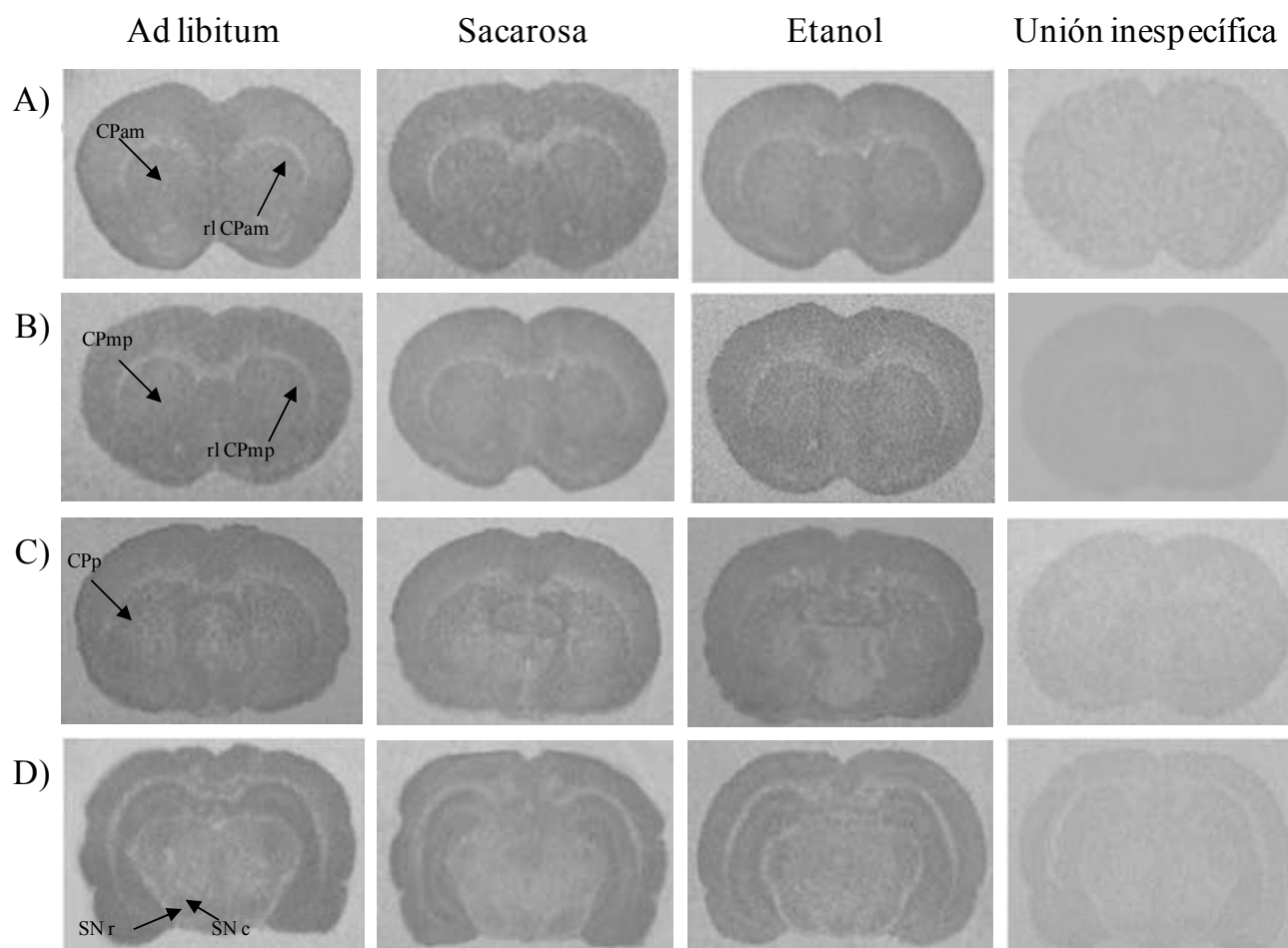


Figura 14. Unión de [^3H]-DPDPE al receptor opioide delta en el caudado-putamen y la *substantia nigra* de ratas Wistar. Los animales fueron tratados crónicamente con etanol al 10% o sacarosa, o mantenidas *ad libitum* durante 4 semanas. Los experimentos de unión de [^3H]-DPDPE se realizaron en cortes coronales de los cerebros de los animales y los análisis se llevaron a cabo por densitometría. La unión inespecífica se determinó en cortes paralelos en presencia de 10 μM de naloxona. **A)** Caudado-putamen anterior-medial (CPam) y región lateral del CPam (rl CPam). **B)** Caudado-putamen medial-posterior (CPmp) y región lateral del CPmp (rl CPmp). **C)** Caudado-putamen posterior (CPp). **D)** *Substantia nigra pars compacta* (SNc) y *substantia nigra pars reticulata* (SNr).

El tratamiento crónico con etanol o sacarosa no modificó la unión de [^3H]-DPDPE en la *pars reticulata* (SNr) y la *pars compacta* (SNc) de la SN (Figura 15). Sin embargo, observamos una tendencia del etanol a disminuir la unión del ligando en la SNc y una tendencia de la sacarosa a aumentarla en la SNr. Cabe señalar que en estas áreas de la SN la variabilidad en los datos fue muy alta. En las autorradiografías las densidades ópticas obtenidas fueron muy bajas y al hacer el análisis de los datos un número importante de animales estuvo en el límite de sensibilidad del ensayo o por debajo del mismo, por lo que tuvimos que eliminar muchas de las lecturas recabadas en los análisis de densitometría de

imágenes. Esto fue particularmente evidente en los animales tratados con etanol. Probablemente esto se debe a la baja densidad del receptor delta en la SN (Mansour et al., 1988). Consideramos importante investigar a profundidad estos efectos en estudios posteriores.

En el CPam, el ANOVA reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{(3,20)}=3.658$, $p<0.030$). En esta región, el tratamiento crónico con sacarosa aumentó 120.2% la unión de [3 H]-DPDPE al receptor delta, mientras que la exposición a etanol no tuvo efecto (Figura 15). El tratamiento con etanol y sacarosa no modificó la unión de [3 H]-DPDPE en el CPmp y el CPp (Figura 15).

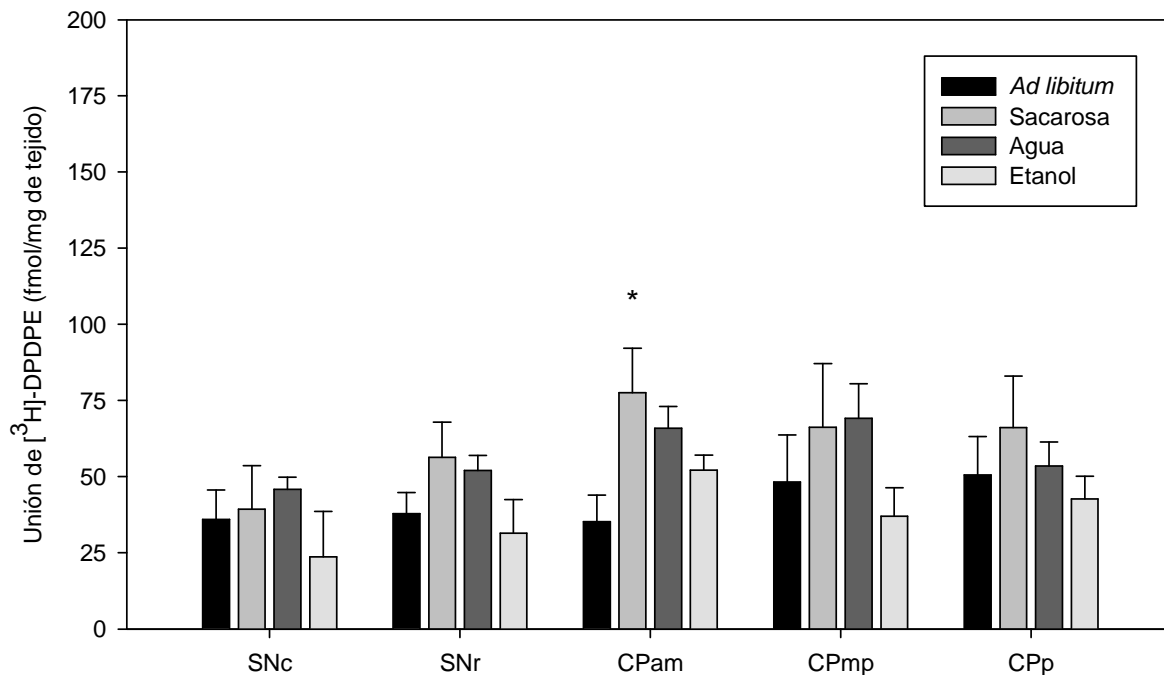


Figura 15. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre la unión de [3 H]-DPDPE al receptor delta en regiones de la vía nigroestriatal de la rata. Los animales fueron tratados como se describió en la figura 13. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM del número de animales indicado. *Substantia nigra pars compacta*=SNc: n=4, *ad libitum* y sacarosa; n=5, agua y n=3, etanol. *Substantia nigra pars reticulata*=SNr: n=5, *ad libitum*; n=6, sacarosa y agua; n=4, etanol. Caudado putamen anterior-medial=CPam: n=6 para cada grupo. Caudado putamen medial-posterior=CPmp: n=5, *ad libitum* y sacarosa; n=6, agua y etanol. Caudado putamen posterior=CPp: n=5, *ad libitum* y sacarosa; n=6, agua y etanol. * $p < 0.030$ versus *ad libitum*.

Dado que la región lateral del CPam y el CPmp contiene la mayor densidad de receptor δ (Mansour et al., 1998), analizamos el efecto crónico de etanol y sacarosa en estas

subregiones. El ANOVA mostró un efecto significativo del tratamiento en la región lateral del CPam ($F_{(3,18)}=4.836$, $p<0.012$). El tratamiento crónico con sacarosa aumentó 117.0% la unión de [3 H]-DPDPE, pero el etanol no tuvo efecto (Figura 16). En la región lateral del CPmp, la exposición a etanol o sacarosa no modificó la unión del ligando al receptor delta (Figura 16), aunque se observó una tendencia del etanol a disminuir la unión del ligando.

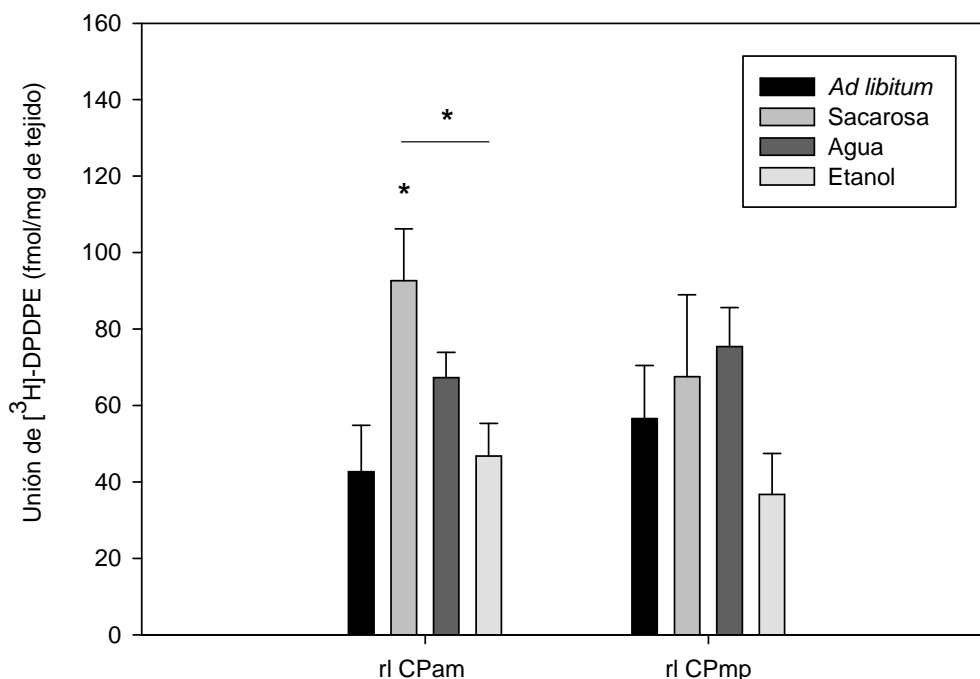


Figura 16. Efecto del tratamiento crónico con etanol y sacarosa sobre la unión de [3 H]-DPDPE al receptor delta en la región lateral del caudado putamen anterior-medial y medial-posterior. Los animales fueron tratados como se describió en la figura 13. Los datos se expresan como el promedio \pm EEM de 5 (*ad libitum* y sacarosa) o 6 (agua y etanol) animales. En la rl CPam también se encontró una diferencia significativa entre el grupo de sacarosa y etanol ($p<0.023$). * $p<0.018$ versus *ad libitum*.

3.4 Niveles de etanol en plasma en animales tratados crónicamente con alcohol

La concentración de etanol en el plasma de los animales al término del tratamiento crónico con alcohol fue de 68.6 ± 4.5 mg/l ($n=8$) versus 54.0 ± 5.0 mg/l ($n=10$) del grupo *ad libitum*, lo que indica que la mayor parte del alcohol ingerido ha sido metabolizada.

CAPITULO IV. DISCUSION DE RESULTADOS

Numerosos estudios han implicado al sistema opioide endógeno en los mecanismos de reforzamiento y recompensa del etanol (Froehlich, 1995; Herz, 1997; Ulm et al., 1995). Sin embargo, el papel de los péptidos opioides en los mecanismos de dependencia al alcohol no ha sido claramente establecido. La mayoría de los estudios que reportan haber manejado tratamientos crónicos con alcohol se han realizado primordialmente en animales seleccionados para preferir alcohol y que consumen grandes cantidades de la droga. En contraste, pocos estudios han evaluado los efectos de la exposición prolongada a alcohol en animales no seleccionados. Además, estos estudios abarcan un número limitado de regiones cerebrales, particularmente del circuito de reforzamiento. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos el efecto del tratamiento crónico con alcohol sobre el contenido de Met-enk y la unión de [³H]-DPDPE al receptor δ en regiones de las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal de ratas Wistar.

Nuestros resultados muestran que la exposición prolongada a etanol aumenta significativamente el contenido de Met-enk en el ATV y la Cpf, sin afectar la unión de [³H]-DPDPE al receptor delta en ninguna de las áreas estudiadas. Sin embargo, observamos una tendencia del etanol a disminuir la unión del ligando en la SNc y en la región lateral del CPmp, efectos que consideramos importante evaluar con más detalle en estudios posteriores.

Los estudios realizados sobre el sistema encefalinérgico en respuesta a la exposición prolongada de etanol han arrojado resultados inconsistentes. Los que han analizado la vía mesocorticolímbica muestran una disminución en el contenido de una de las formas extendidas de la Met-enk (i.e., Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷) en el ATV de ratas AA en respuesta a un tratamiento crónico con etanol al 10% durante 5 semanas (Ploj et al., 2002), así como en ratones C57BL/6J por 4 semanas (Ploj et al., 2000). Este último cambio solo se observa 5 días después del tratamiento. Sin embargo, el grupo de Nylander y colaboradores (1994) mostró que el tratamiento crónico con una solución de etanol al 10% por 4 semanas no modifica el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en el ATV de ratas AA. En el caso de la Cpf, no existen reportes de efectos crónicos de etanol sobre el contenido de Met-enk. Por otra

parte, el tratamiento crónico con etanol (10% por 4 semanas) aumenta el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en el NAcc de ratas AA (Nylander et al., 1994), mientras que la exposición *in utero* a etanol (6.6% por 6 semanas) disminuye el contenido de Met-enk en el NAcc de ratas Sprague-Dawley 1 h después del tratamiento (Druse et al., 1999).

En relación a la vía nigroestriatal, el tratamiento con etanol al 10% por 5 semanas disminuye el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en la SN de ratas AA (Ploj et al., 2002). En estas ratas también se ha demostrado que el tratamiento crónico con etanol (10% por 4 semanas) no modifica el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en el CP (Nylander et al., 1994). La exposición a etanol al 7% por 14 días (Seizinger et al., 1983) o al 20% por 30 días (Schulz et al., 1980) disminuye el contenido de Met enk en el CP de ratas Sprague-Dawley.

En otras áreas del cerebro, el tratamiento con etanol al 10% por 5 semanas disminuye el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en la Amg de ratas AA (Ploj et al., 2002). Un tratamiento similar (10% por 4 semanas) no modifica el contenido de Met-enk⁵-Arg⁶-Phe⁷ en el hipotálamo de estos animales (Nylander et al., 1994). Además, el etanol (7% por 14 días) disminuye el contenido de Met-enk y Leu-enk en el hipotálamo de ratas Sprague-Dawley (Seizinger et al., 1983). El mismo tratamiento disminuye el contenido de Leu-enk pero no modifica los niveles de Met-enk en el Hp de ratas Sprague-Dawley (Seizinger et al., 1983). El conjunto de estos datos indica que existen diferencias importantes en la respuesta del sistema encefalinérgico a la exposición prolongada de alcohol, particularmente cuando se comparan animales seleccionados para preferir alcohol y roedores no seleccionados. Estas discrepancias pueden explicarse como diferencias en los protocolos utilizados, particularmente en lo que se refiere a la dosis de etanol utilizada y al tiempo de exposición a la droga, así como a la cepa o línea de roedores estudiada.

El aumento en el contenido de Met-enk en el ATV y la Cpf encontrado en este trabajo podría explicarse por un efecto inhibitorio del etanol sobre la liberación del péptido. De esta manera, una reducción en la liberación de Met-enk mantendría más tiempo al péptido dentro de las vesículas secretoras. Esta hipótesis sería consistente con una inhibición de esta vía opioidérgica por etanol, dado que el tratamiento crónico con la droga no modificó la unión de [³H]-DPDPE al receptor δ en estas áreas (ver más adelante). Anteriormente se

ha reportado que la administración aguda de etanol aumenta la liberación de Met-enk en el NAcc (Marinelli et al., 2005; Méndez et al., 2010), pero no tiene efecto en el cerebro medio/ATV o el núcleo central de la amígdala (Jarjour et al., 2009; Lam et al., 2008), lo que indica que los efectos del etanol son específicos dependiendo del área cerebral. Desafortunadamente, no existen estudios de la administración crónica de etanol sobre la liberación de péptidos opioides. Por lo tanto, queda por determinar si la exposición prolongada a la droga induce cambios neuroadaptativos en los sistemas opioidérgicos a nivel de la liberación, los cuales podrían ser opuestos a los inducidos por la administración aguda de la sustancia.

Por otra parte, existe la posibilidad de que el tratamiento crónico con alcohol induzca incrementos en la expresión del RNAm de la Pro-enk, aumente la estabilidad del RNAm y/o alteraciones en el procesamiento post-traduccional del precursor. Esta propuesta concuerda con resultados de otros autores, quienes han reportado incrementos en la expresión del RNAm de la Pro-enk en respuesta a distintos tratamientos crónicos con la droga. Por ejemplo, la exposición a etanol al 5% por 8 semanas aumenta los niveles del RNAm de la Pro-enk o Pre-proenk en el núcleo central de la Amg de ratas Fawn Hooded (FH) (Cowen y Lawrence, 2001). Además, la exposición *in utero* a etanol al 6.6% por 6 semanas aumenta la expresión de este RNAm en el “core” del NAcc de crías de 5, 12 y 19 días de edad en ratas Sprague-Dawley (Druse et al., 1999). La expresión de otros RNAm de precursores de péptidos opioides también es afectada por el tratamiento crónico con etanol. El RNAm de Pro-din en el hipotálamo, el Hp, el NAcc, el estriado, el septum y el tubérculo olfatorio de ratones C57BL/6 aumenta en respuesta a la exposición crónica de etanol (Guly et al., 1993). Sin embargo, algunos estudios también han reportado disminuciones en la expresión de los RNAm de los precursores de los péptidos opioides. El tratamiento crónico con etanol (5% por 8 semanas) disminuye los niveles de RNAm de Pro-enk en el NAcc y el estriado de ratas FH en comparación con las Wistar-Kyoto (Cowen et al 1998). Una dosis reto de etanol de 2.5 g/kg en ratas Sprague-Dawley tratadas crónicamente con alcohol por 5 semanas y sometidas a un período de abstinencia de 2 semanas, disminuye el RNAm de Pro-enk en el CP, en comparación con las ratas tratadas de forma aguda (Yang et al., 1998). El conjunto de estos datos indica que, como en el caso del contenido de Met-enk, la respuesta a la exposición a etanol puede ser alterada

dependiendo de la dosis y el tiempo de duración, así como de la cepa o línea de roedor. Así, nuestros resultados sugieren que una inhibición de la liberación y/o cambios en la expresión de encefalinas podrían ser parte de las neuroadaptaciones desencadenadas por la exposición prolongada a alcohol. Además, el sistema mesocortical (i.e., ATV y Cpf) parece ser más susceptible a los efectos crónicos del etanol que las áreas de la vía nigroestriatal.

El tratamiento crónico con etanol no modificó la unión de [³H]-DPDPE al receptor δ en ninguna de las regiones estudiadas en este trabajo. Se han reportado distintos efectos del etanol sobre la unión de ligandos selectivos del receptor δ . Por ejemplo, la exposición crónica a etanol al 15% (3 semanas) (Pfeiffer et al., 1981) o al 6% (3 semanas) (Lucchi et al., 1984) aumenta la afinidad de DADLE por su receptor en membranas de estriado de rata. Sin embargo, también se ha reportado que el tratamiento con etanol al 6% durante 3 semanas disminuye la afinidad de la Met-enk por el receptor δ (Lucchi et al., 1984). Estudios en ratones C57B1 muestran que el tratamiento crónico con etanol (59.6 g/l) durante 7 días y con un período de abstinencia de 24 h no tiene efecto sobre la unión de DADLE al receptor δ en membranas de corteza frontal (Khatami et al., 1987). Estos datos indican que la activación de receptores opioides participa en el alto consumo de alcohol.

Nuestros resultados indican que el etanol crónico no altera ni la afinidad del ligando ni el número de receptores δ en las regiones estudiadas. Probablemente, los cambios sobre la unión de [³H]-DPDPE se producen solo al inicio del período de ingesta de la droga (después de la exposición aguda a etanol), como se ha reportado previamente (Méndez et al., 2004). De esta manera, es posible que se produzcan cambios neuroadaptativos en el sistema a lo largo del tiempo que busquen compensar los efectos de la exposición continua a la droga. Por otra parte, es posible que el etanol tenga un efecto inhibitorio sobre el acoplamiento del receptor δ a las proteínas G en algunas áreas cerebrales, como se ha reportado en el Hp (giro dentado y CA1), el cerebelo y el colículo inferior de ratas Sprague-Dawley después de 16 días de tratamiento con etanol al 6.7 % (Saland et al., 2004). Estos autores utilizan un análogo no hidrolizable de GTP ([³⁵S] γ GTP) que permite investigar el estado del acoplamiento del receptor a la proteína G. Consideramos que este aspecto

debe ser investigado en un futuro, con el objeto de determinar si la exposición crónica a etanol afecta la funcionalidad del receptor δ .

A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, el mismo tratamiento con alcohol no afectó el contenido de la β -end en el ATV, la SN, el NAcc, la Cpf o el hipotálamo. (Leriche y Méndez, 2010). La unión de [3 H]-DAMGO al receptor opioide μ en el ATV, el NAcc (“core” y “shell”) o la Cpf tampoco se ve alterada por la exposición crónica a alcohol (Leriche y Méndez, 2010). Por lo tanto, los sistemas encefalinérgico y β -endorfinérgico parecen tener una sensibilidad distinta a la droga. Nuestros resultados sugieren que la administración crónica de etanol produce efectos selectivos sobre la vía encefalinérgica.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la administración aguda de etanol (2.5 g/kg) disminuye el contenido de β -end en el hipotálamo (Leriche y Méndez, 2010), así como los niveles de Met-enk en el NAcc y el CP de ratas Wistar (Méndez et al., 2010). Una dosis menor de etanol (0.5 g/kg) disminuye el contenido de Met-enk en la Cpf (Méndez et al., 2010). Por otra parte, el tratamiento agudo con una dosis alta de etanol (2.5 g/kg) modifica selectivamente la unión de [3 H]-DAMGO y [3 H]-DPDPE a los receptores μ y δ respectivamente, en distintas áreas cerebrales y con distintos patrones cinéticos. El etanol aumenta la unión de [3 H]-DAMGO en la Cpf, la disminuye en la VTA, el “shell” del NAcc y la SNr y no tiene efecto en el CP (Méndez et al., 2001; Méndez et al., 2003). En contraste, la administración aguda de etanol (2.5 g/kg) aumenta la unión de [3 H]-DPDPE en la Cpf, el NAcc (“core” y “shell”), la SNr y el CP (Méndez et al., 2004). En general, nuestros resultados muestran que los efectos del tratamiento crónico con etanol sobre el contenido de encefalinas y la unión de [3 H]-DPDPE al receptor δ son opuestos (o no tienen efecto) a los observados en respuesta a la exposición aguda de la droga, como se ha reportado en el caso de algunos neurotransmisores (i.e., GABA y glutamato) (de Witte et al., 2005). Así, los cambios inducidos por la exposición prolongada a etanol sobre los sistemas encefalinérgicos podrían constituir neuroadaptaciones del cerebro a la presencia continua de la droga. Estos cambios podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la dependencia a etanol. Es importante mencionar que en este trabajo solo estudiamos los efectos del etanol al término del tratamiento crónico, por lo que es necesario investigar los cambios que podrían producirse después de un período de

abstinencia de la droga, ya que es en esta etapa cuando se presentan las alteraciones más pronunciadas (de Witte et al., 2005).

En contraste con los efectos del etanol reportados en este trabajo, el tratamiento crónico con sacarosa aumentó el contenido del péptido en el NAcc y el hipotálamo, así como la unión de [³H]-DPDPE a su receptor en la Cpf y el CPam. De manera interesante, observamos que la sacarosa tiende a aumentar la unión del ligando en el NAcc, tanto en el “core” como en el “shell”, efecto que debe ser corroborado en estudios posteriores.

Es ampliamente conocido que los azúcares son sustancias que ejercen reforzamiento positivo (Wheeler y Carelli, 2009; Herz 1997). Los aumentos observados en este trabajo en el contenido de Met-enk y de unión de [³H]-DPDPE al receptor δ inducidos por la sacarosa podrían estar relacionados con mecanismos de palatabilidad. Algunos estudios han reportado que el alimento con alta palatabilidad altera la expresión de encefalinas y dinorfinas en el estriado y el núcleo arcuato del hipotálamo, respectivamente (Kelley et al., 2003; Welch et al., 1996). Nuestros resultados sugieren, además, que la Met-enk juega un papel importante en las propiedades reforzadoras de la sacarosa. En este sentido, Kelley y colaboradores (2002) reportaron que los mecanismos de palatabilidad están bajo regulación opioidérgica en el NAcc. Por otra parte, los efectos diferenciales del etanol y la sacarosa observados en este trabajo concuerdan con estudios en los que se muestra que las drogas de abuso (i.e., cocaína y etanol) y los reforzadores naturales (i.e., alimento y agua) producen una activación diferencial de distintas poblaciones de neuronas en el NAcc (Wheeler y Carelli, 2009; Robinson y Carelli, 2008). Por lo tanto, los mecanismos implicados en los efectos de las drogas de abuso y los reforzadores naturales en el NAcc (y probablemente en otras regiones cerebrales, como el ATV, la Cpf, el hipotálamo y el CP) podrían ser distintos. De la misma manera, el papel de los sistemas opioidérgicos en los mecanismos de acción del etanol y la sacarosa podría ser distinto e implicar diferentes áreas cerebrales. Los resultados de este trabajo, así como datos previos de nuestro laboratorio apoyan esta hipótesis, ya que la exposición crónica a sacarosa aumenta el contenido de β -end en el NAcc y la SN de ratas Wistar, pero no modifica la unión de [³H]-DAMGO al receptor μ en la VTA, la Cpf y el NAcc (“core” y “shell”) (Leriche y Méndez, 2010).

CAPITULO V. CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

Nuestros resultados muestran que la exposición prolongada a alcohol y/o sacarosa induce cambios selectivos en neuronas encefalinérgicas de las vías mesocorticolímbica y nigroestriatal, así como del hipotálamo. Estos datos sugieren que los mecanismos neurales de reforzamiento del etanol y la sacarosa son distintos e implican la activación diferencial de neuronas opioidérgicas en áreas cerebrales específicas. Así, los mecanismos de acción del etanol parecen implicar la activación de neuronas encefalinérgicas en el ATV y la Cpf, mientras que los efectos de la sacarosa se producen en un mayor número de regiones (Cpf, NAcc, CP e hipotálamo). Quedan por confirmar los efectos del etanol sobre la unión de [³H]-DPDPE en la SNc y la región lateral del CPmp, y de la sacarosa sobre la unión del ligando en el NAcc. Sería importante realizar estudios enfocados a determinar la funcionalidad del receptor δ en animales tratados crónicamente con etanol, así como investigar las alteraciones que podrían producirse en el sistema encefalinérgico durante la abstinencia a la droga. Además, este trabajo debería completarse con estudios de los efectos del etanol sobre la expresión del RNAm de la Pro-enk, así como sobre la liberación de la Met-enk Finalmente, creemos que sería interesante explorar con mayor detalle los efectos producidos por la sacarosa sobre los sistemas encefalinérgicos.

ANEXO I**Reactividad cruzada del anticuerpo E-8 contra Met-enk (Asai et al., 1998)**

Anticuerpo realizado en conejo New Zealand, que está dirigido contra la secuencia de Met-enk en rata.

Péptido	% Reactividad cruzada
	Anti-ME E-8
Met-(o)-encefalina	100.00
Met-encefalina	2.90
Leu-encefalina	0.01
Met-encefalina-Arg	0.76
Leu-encefalina-Arg	<0.01
Met-encefalina-Arg-Phe	<0.01
Met-encefalina-Arg-Gly-Leu	<0.01
Dinorfina 1-8	<0.01
α -endorfina	<0.01
β -endorfina	<0.01
γ -endorfina	<0.01

ANEXO II

Preparación del estándar interno

Se preparó un estándar interno de Met-enk a partir de estriado de rata de la siguiente manera:

1. Se obtuvieron los estriados (36) (región anterior-medial) de 18 ratas Wistar ♂ (250-300g).
2. Se añadió ácido acético 1N en hielo (2 estriados/500 μ l) y se hirvió por 20 min en baño maría.
3. Se preparó un homogenado por sonicación.
4. Se centrifugó a 15000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes de cada tubo, se juntaron y se hicieron alícuotas de 500 μ l, las cuales se evaporaron a sequedad y se almacenaron a -20°C hasta su uso.
5. El extracto seco se resuspendió en un total de 25 ml de H₂O estéril y se hicieron alícuotas de 100 μ l para usar en cada RIA. Se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

ANEXO III

Preparación de soluciones para la determinación de proteínas (Lowry et al., 1951).

A) Carbonato de Sodio al 2 % en NaOH 0.10 N.

Se guarda a 4°C.

B) Sulfato Cúprico al 1 %.

Se protege de la luz y se guarda a 4°C.

C) Tartrato de Sodio y Potasio ($C_4H_4KNaO_4 \bullet 4H_2O$) al 2 %.

Se prepara en H_2O desionizada y se guarda a 4°C.

D) Reactivo de Folin-Ciocalteu, dilución 1:1 en H_2O desionizada.

1 ml del reactivo + 1 ml de H_2O desionizada.

Se prepara inmediatamente antes de usar, protegiendo de la luz.

E) Reactivo de Cobre.

Tomar 50 ml de la solución A + 0.5 ml de la solución B + 0.5 ml de la solución C.

Se prepara inmediatamente antes de usar.

F) Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma, fracción V)

Se prepara a una concentración de 1 mg/ml en H_2O desionizada, se hacen alícuotas y se congelan.

REFERENCIAS

- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. (1984) Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 223-255.
- Asai M., Vindrola O., Zubieta M., Talavera E. y Massarini A. (1988) Diurnal variations of IR-Met-enkephalin in the brain of pentylenetetrazol-kindled rats. *Brain Res.* 442(1): 81-85.
- Asai M. y Gutiérrez R. (1994) Neurobiología de los péptidos opioides. *Salud Mental.* 17(2): 30-43.
- Asai M., Zubieta M., Matamoros-Trejo G., Linares G. y Agustín P. (1998) Diurnal variations of opioid peptides and synenkephalin in vitro release in the amygdala of kindled rats. *Neuropeptides.* 32 (3): 293-299.
- Azaryan A.V., Coughlin L.J., Búzás B., Clock B.J. y Cox B.M. (1996) Effect of chronic cocaine treatment on μ and δ -opioid receptor mRNA levels in dopaminergically innervated brain regions. *J. Neurochem.* 66: 443-448.
- Bhargava HN, Rapaka RS, Renugopalakrishnan V. (1988) Effect of ethanol on the binding of conformationally rigid and labile ligands of opioid receptors to rat brain membranes. *Biochem. Pharmacol.* 37(11): 2279-2283.
- Blum K. y Briggs A.H. (1988) Opioid peptides and genotypic responses to ethanol. *Biogenic Amines.* 5: 527-533.
- Borsodi A., y Tóth G. (1995) Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann. N Y Acad. Sci.* 757: 339-352.
- Bucher T. y Redetzki H. (1951) Specific photometric determination of ethyl alcohol based on an enzymatic reaction (Eine Spezifische Photometrische Bestimmung von Athylalkohol auf Fermentativen Wege. *Klin Wochenschr.* 29(35-36): 615-616.
- Buisman-Pijlman F.T., Gerrits M.A. y Van Ree J.M. (2009) Increased opioid release in specific brain areas in animals exposed to prenatal morphine and emotional stress later in life. *Neuroscience.* 159(1): 405-413.
- Carlson, R. (2010). *Fisiología de la conducta.* Ed. Pearson, 8ªedición.
- Carr G.D., Fibiger H.C. y Phillips A.G. (1989) Conditioned place preference as a measure of drug reward. En: *The neuropharmacological basis of reward.* (Liebman JM., y Cooper SJ., eds) Oxford Scientific Publications, Oxford, pp 264–319.
- Cheng F., McLaughlin P.J., Banks W.A. y Zagon I.S. (2010) Internalization of the opioid growth factor, [Met5]-enkephalin, is dependent on clathrin-mediated endocytosis for downregulation of cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(3): 774-785.

- Churchill L, Bausback HH, Gerritsen ME. y Ward PE. (1987) Metabolism of opioid peptides by cerebral microvascular aminopeptidase M. *Biochim Biophys Acta.* 923(1): 35-41.
- Cowen M.S. y Lawrence A.J. (2006) Alcoholism and neuropeptides: an update. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 5(2): 233-239.
- Cowen M.S, Rezvani A., Jarrott B. y Lawrence AJ. Distribution of opioid peptide gene expression in the limbic system of Fawn-Hooded (alcohol-preferring) and Wistar-Kyoto (alcohol-non-preferring) rats. *Brain Res.* 796(1-2): 323-326.
- Crabbe J.C., Phillips T.J., Harris R.A., Arends M.A. y Koob G.F. (2006) Alcohol-related genes: contributions from studies with genetically engineered mice. *Addict. Biol.* 11(3-4): 195-269.
- Deby-Dupont G., Reuter A.M., Joris J., Vrindts-Gevaert Y. y Franchimont P. (1983). Labeling of beta-endorphin and beta-lipotropin with iodine 125. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 177: 259-268.
- de Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martinez L. y Joseph-Bravo P. (2000). Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem. Int.* 37: 483-496.
- de Waele JP. y Gianoulakis C. (1994) Enhanced activity of the brain beta-endorphin system by free-choice ethanol drinking in C57BL/6 but not DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol.* 258(1-2): 119-129.
- de Waele J.-P., Kiianmaa K. y Gianoulakis C. (1995) 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: 518-527.
- de Waele J-P., Papachristou DN., y Gianoulakis C (1992) The alcohol-preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hypothalamic b-endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding BDA/2 mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 788–794
- De Witte P, Littleton J, Parot P, Koob G. (2005) Neuroprotective and abstinence-promoting effects of acamprosate: elucidating the mechanism of action. *CNS Drugs.* 19(6): 517-537.
- Di Chiara G. e Imperato A. (1985) Ethanol preferentially stimulates dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 115(1): 131-132.
- Di Chiara G. y North R.A. (1992). Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(5): 185-193.
- Druse MJ., Hao HL., y Eriksen JL. (1999) In utero ethanol exposure increases proenkephalin, a precursor of a neuropeptide that is inhibitory to neuronal growth. *Alcohol Clin Exp Res.* 23(9): 1519-1527.

- Duncan P.M. y Baez A.M. (1981) The effect of ethanol on wheel running in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15(5): 819-821.
- Earleywine M. (1994) Anticipated biphasic effects of alcohol vary with risk for alcoholism: a preliminary report. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 18(3): 711-714.
- Eddy N.B., Halbach H., Isbell H. y Seevers M.H. (1965) Drug dependence: Its significance and characteristics. *Bull World Health Organ* 32: 721–733.
- Edwards G., Arif A. y Hadgson R. (1981) Nomenclature and classification of drug- and alcohol-related problems: A WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 59: 225–242.
- Esel E. (2006) Neurobiology of alcohol withdrawal inhibitory and excitatory neurotransmitters. *Turk Psikiyatri Derg.* 17(2): 129-137.
- Fadda F., Mosca E., Colombo G. y Gessa G.L. (1989) Effect of spontaneous ingestion of ethanol on brain dopamine metabolism. *Life Sci.* 44(4): 281-287.
- Fadda F., y Rossetti ZL. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 56(4): 385-431.
- Fillingim R.B, Kaplan L., Staud R., Ness T.J., Glover T.L., Campbell C.M., Mogil J.S. y Wallace M.R.(2005) The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans.*J Pain*, 6(3): 159-167.
- Florentin D., Sassi A. y Roques B.P. (1984) A highly sensitive fluorometric assay for "enkephalinase," a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine-glycine-glycine from enkephalins. *Anal Biochem.* 141(1): 62-69.
- Froehlich J.C. (1995) Genetic factors in alcohol self-administration. *J. Clin. Psychiatry. Suppl* 7: 15–23.
- Fukuda K., Kato S. y Mori K. (1995) Location of regions of the opioid receptor involved in selective agonist binding. *J Biol Chem.* 270(12): 6702-6709.
- Fulcher I.S. y Kenny A.J. (1983) Proteins of the kidney microvilliar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys. *Biochem. J.* 211(3): 743-753.
- Gessa G.L., Muntoni F., Collu M., Vargiu L. y Mereu G.(1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 348(1): 201-203.
- Ghozland S., Chu K., Kieffer B.L. y Roberts A.J. (2005) Lack of stimulant and anxiolytic-like effects of ethanol and accelerated development of ethanol dependence in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology.* (4): 493-501.
- Gianoulakis C (1993) Endogenous opioids and excessive alcohol consumption. *J Psychiatr Neurosci.* 18: 148–156.

- Gianoulakis C. (1996) Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. *Alcohol Alcohol Suppl.* (1): 33-42.
- Gianoulakis C. y 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(24): 2315-2325.
- Gianoulakis C., Krishnan B. y Thavundayil J. (1996) Enhanced sensitivity of pituitary beta-endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Archives of General Psychiatry.* 53: 250-257.
- Gingras M.A. y Cools A.R. (1996) Analysis of the biphasic locomotor response to ethanol in high and low responders to novelty: a study in Nijmegen Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl).* 125(3): 258-264
- Greenwood F.C., Hunter W.M. y Glover J.S. (1963) The preparation of ^{125}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123.
- Gulya K., Orpana AK., Sikela JM., y Hoffman PL. (1993) Prodynorphin and vasopressin mRNA levels are differentially affected by chronic ethanol ingestion in the mouse. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 1993 20(1-2): 1-8.
- Hernandez-Vazquez F. y Méndez M. (2006) Stimulant and depressant behavioral actions of Alcohol in non-selected Wistar rats. En: *New Trends in Brain Research* (F.J. Chen, ed), Nova science Publishers, Inc., New York, pp 127-142.
- Herz A. (1997) Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology.* 129: 99-111.
- Herz A. (1998) Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76(3): 252-258.
- Herz A. y Spanagel R. (1995) Endogenous opioids and addiction. En: *The pharmacology of opioids.* (Tseng LF., ed), Harwood, Germany, pp 445-462
- Hiller JM, Angel LM, Simon EJ. (1981) Multiple opiate receptors: alcohol selectively inhibits binding to delta receptors. *Science.* 214(4519): 468-469.
- Hiller J.M., Fan L.Q. y Simon E.J. (1996) Autoradiographic comparison of [^3H]DPDPE and [^3H]DSLET binding: evidence for distinct delta 1 and delta 2 opioid receptor populations in rat brain. *Brain Res.* 719(1-2): 85-95.
- Holaday, J.W. (1985) Endogenous opioids and their receptors. *Current Concepts.* Kalamazoo, MI: Scope Publications Upjohn.
- Hoffman PL., Urwyler S., y Tabakoff B. (1982) Alterations in opiate receptor function after chronic ethanol exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222(1): 182-189.

- Howells R.D., Kilpatrick D. L., Bhatt R., Monahan J.J., Poonian M. y Udenfriend S. (1984) Molecular cloning and sequence determination of rat preproenkephalin cDNA: sensitive probe for studying transcriptional changes in rat tissues. *Proc Natl Acad. Sci.* 81: 7651-7655.
- Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962a) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature.* (5)194: 495-496.
- Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962b) The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 85: 39
- Ingman K., Kupila J., Hyytiä P., y Korpi ER. (2006) Effects of aripiprazole on alcohol intake in an animal model of high-alcohol drinking. *Alcohol Alcohol.* 41(4): 391-398.
- Ikemoto S., McBride WJ., Murphy JM., Lumeng L., y Li TK. (1997) 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.* 21(6): 1042-1046.
- Jamensky NT. y 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(2-3): 177-187.
- Kelley AE., Bakshi VP., Haber SN., Steininger TL., Will MJ., y Zhang M. (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.* 76(3): 365-377.
- Kelley AE., Will MJ., Steininger TL., Zhang M., y Haber SN. (2003) Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure(R)) alters striatal enkephalin gene expression. *Eur. J. Neurosci.* 18(9): 2592-2598.
- Khatami S, Hoffman PL, Shibuya T, Salafsky B. (1987) Selective effects of ethanol on opiate receptor subtypes in brain. *Neuropharmacology.* 26(10): 1503-1507.
- Koob G.F. (1992a) Neural Mechanisms of Drug Reinforcement. *The Neurobiology of Drug and Alcohol Addiction.* Ann. N Y Acad. Sci. 654: 171-191.
- Koob G.F. (1992b) Drugs of abuse: Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* (13): 177-184.
- Koob G.F. y Goeders N.E. (1989) Neuroanatomical substrates of drug self-administration. En: *The neuropharmacological basis of reward.* (Liebman JM, y Cooper SJ., eds) Oxford Science Foundation, pp 214–263
- Koob G.F. y Le Moal M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278(5335): 52-58.
- Koob G.F. y Le Moal M. (2001) Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology.* 24(2): 98-129.

- Koob G. F., Sanna P. P. y Bloom F. E. (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron*. 21: 467–476.
- Kornet M., Goosen C. y Van Ree JM. (1992) Opioid modulation of alcohol intake in monkeys by low doses of naltrexone and morphine. *Ann N Y Acad Sci*. 654: 469-471.
- Kosterlitz H.W y Hughes J. (1975) Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. *Life Sci*. 17(1): 91-96.
- Lam M.P., Marinelli P.W., Bai L. y Gianoulakis C. (2008) Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)*. 201(2): 261-271.
- Lazarus L.H., Bryant S.D., Salvadori S., Attila M. y Sargent Jones L. (1996) Opioid infidelity: novel opioid peptides with dual high affinity for delta- and mu-receptors. *Trends Neurosci*. 19(1): 31-35.
- Leff P., Acevedo R., Valdés A., Martínez I., Morales A., Calva JC. y Antón B. (2000) Otro sistema de transmisión opioide en el cerebro de los mamíferos. Las endomorfinas y el receptor opioide mu. Parte II. *Salud Mental* 23(2): 36-41
- Leriche M., y Méndez M. (2010) Ethanol exposure selectively alters beta-endorphin content but not [3H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain. *Neuropeptides*. 44(1):9-16.
- Li X.W., Li T.K. y 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. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.
- Lucchi L., Rius R.A., Uzumaki H., Govoni S. y Trabucchi M. (1984) Chronic ethanol changes opiate receptor function in rat striatum. *Brain Res*. 293(2): 368-371.
- Mann K. (2004) Pharmacotherapy of alcohol dependence: a review of the clinical data. *CNS Drugs*, 18: 485-504.
- Mansour A., Fox CA., Akil H., y Watson SJ. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*. 18(1): 22-29.
- Mansour A., Khachaturian H., Lewis ME., Akil H., y Watson SJ. (1988) Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurol. Sci*. 11: 308–314.
- Marinelli P.W., Bai L., Quirion R. y Gianoulakis C. (2005) A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res*. 29(10): 1821-1828.
- Marinelli P.W., Kiianmaa K. y Gianoulakis C. (2000) Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci*. 66: 1915-1927.

- Marinelli PW, Quirion R, y Gianoulakis C. (2003) A microdialysis profile of beta-endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Psychopharmacology (Berl)* 169(1): 60-67.
- Martin C.S., Earleywine M., Musty R.E., Perrine M.W. y Swift R.M. (1993) Development and validation of the Biphasic Alcohol Effects Scale. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17(1): 140-146.
- Martin-Kleiner I., Balog T. y Gabrilovac J. (2006) Signal transduction induced by opioids in immune cells: a review. *Neuroimmunomodulation.* 13(1): 1-7.
- Mayas M.D., Ramirez-Exposito M.J., Garcia M.J., Carrera P. y Martínez-Martos J.M. (2004) Ethanol modulates neuropeptide degrading aminopeptidases at synapse level in calcium-dependent conditions. *Alcohol Alcohol.* 39(5): 393-405.
- McBride WJ., y Li TK. (1998) Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12(4): 339-369.
- Melendez RI., Rodd ZA., McBride WJ., y Murphy JM. (2005) Dopamine receptor regulation of ethanol intake and extracellular dopamine levels in the ventral pallidum of alcohol preferring (P) rats. *Drug Alcohol Depend.* 77(3): 293-301.
- Méndez M. y Cruz C. (1999a) Mecanismos cerebrales de reforzamiento del alcohol. I. Efectos sobre el comportamiento. *Salud Mental.* 22(1): 46-51.
- Méndez M. y Cruz C. (1999b) Mecanismos cerebrales de reforzamiento del alcohol. II. Bases neuroquímicas: papel del sistema opioide. *Salud Mental.* 22(1): 52-59.
- Méndez M., Leriche M. y Calva J.C. (2001) Acute ethanol administration differentially modulates mu opioid receptors in the rat meso-accumbens and mesocortical pathways. *Mol. Brain Res.* 94: 148-156.
- Méndez M., Leriche M. y Calva J.C. (2003) 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.* 47: 153–160.
- Méndez M. y Morales-Mulia M. (2008a) Role of mu and delta opioid receptors in alcohol dinking behaviour. *Curr. Dru Abuse Rev.* 1, 239-252.
- Méndez M. y Morales-Mulia M. (2008b) Ethanol exposure and Pro-enkephalin mRNA expression in regions of the mesocorticolimbic system. En: *Research on the Neurobiology of Alcohol Use Disorders.* (Sher, L. ed), Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 177-202.
- Méndez M. y Morales-Mulia M. (2008c) Role of endogenous opioid peptides in alcohol reinforcement. En: *Neural mechanisms of action of drugs of abuse and natural reinforcers.* (Méndez y Mondragón-Ceballos, eds), Research Singpost, India, pp. 41-60.

- Méndez M., Morales-Mulia M. y Leriche M. (2004) [³H]-DPDPE binding to δ opioid receptors in the rat mesocorticolimbic and nigrostriatal pathways is transiently increased by acute ethanol administration. *Brain Res.* 1028: 180–190.
- Méndez M. y Morales-Mulia M. (2006) Ethanol exposure differentially alters pro-enkephalin mRNA expression in regions of the mesocorticolimbic system. *Psychopharmacology (Berl)*. 189(1): 117-124.
- Méndez M., Morales-Mulia M., y Pérez-Luna J.M. (2008) Ethanol-induced changes in proenkephalin mRNA expression in the rat nigrostriatal pathway. *J Mol Neurosci.* 34(3): 225-234.
- Mereu G., Fadda F. y Gessa G.L. (1984) Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res.* 292: 63-69.
- Milton G.V., Randall P.K. y Erickson C.K. (1995) Low-dose effect of ethanol on locomotor activity induced by activation of the mesolimbic system. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19(3): 768-776.
- Mucha R.F. y Herz A. (1985) Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology.* 86: 274–280.
- Mucha R.F. e Iversen S.D. (1984) Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. *Psychopharmacology.* 82: 241–247.
- Mucha R.F., Millan M.J. y Herz A. (1985) Aversive properties of naloxone in non-dependent (naive) rats may involve blockade of central β -endorphin. *Psychopharmacology.* 86: 286–285.
- Myers R.D., Borg S. y Mossberg R. (1986) Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey. *Alcohol.* 3(6):383-388.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. (1993) Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11(6): 995-1006.
- Nestler, E.J.; Hyman, S.E. y Malenka, R.C. (2001) Reinforcement and Addictive Disorders. En: *Molecular Neuropharmacology: A foundation for Clinical Neuroscience.* McGraw-Hill, E.U.A, pp. 355-382.
- Ng GYK., O'Dowd BF. y George SR. (1996) Genotypic differences in mesolimbic enkephalin gene expression in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. *Eur. J. Pharmacol.* 311: 45-52.

- Nylander I., Hyytiä P., Forsander O. y Terenius L. (1994) Differences between Alcohol-Preferring (AA) and Alcohol-Avoiding (ANA) rats in the Prodynorphin and Proenkephalin Systems. *Alcohol Clin Exp Res*, 18: 1272-1279.
- Olive MF., Koenig HN., Nannini MA., y Hodge CW. (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J. Neurosci.* 21(23): 1-5.
- O'Malley S.S., Jaffe A.J., Chang G., Schottenfeld R.S., Meyer R.E. y Rousanville B. (1992) Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence: a controlled study. *Arch Gen Psychiatry.* 49:881-888.
- Oscar-Berman M., Shagrin B. Evert D.L. y Epstein C. (1997) Impairments of Brain and Behavior. *Alcohol Health and Research World.* 21(1):65-75.
- Overstreet D.H. (2002) Behavioral characteristics of rat lines selected for differential hypothermic responses to cholinergic or serotonergic agonists. *Behav. Genet.* 32(5): 335-348.
- Paxinos G., y Watson C. (1998) *ATLAS The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates.* 4th Edition, Academic Press. San Diego.
- Pfeiffer A, Seizinger BR, Herz A. (1981) Chronic ethanol imbibition interferes with delta-, but not with mu-opiate receptors. *Neuropharmacology.* ;20(12A): 1229-1232.
- Pitt E.K., (ed). (2008) *Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research.* International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). *Cell Preservation Technology.* 6(1).
- Ploj K., Roman E., Kask A., Hyytiä P., Schiöth H.B., Wikberg J.E. y Nylander I. (2002) Effects of melanocortin receptor ligands on ethanol intake and opioid peptide levels in alcohol-preferring AA rats. *Brain Res Bull.* 59(2): 97-104.
- Poklis A. y Mackell M.A. (1982) Evaluation of a modified alcohol dehydrogenase assay for the determination of ethanol in blood. *Clin Chem* 28(10): 2125-2127.
- Ramirez J.L., Díaz-Martinez A., Gutiérrez-Aguilar J., Alfaro-Torres J. e Iñiguez-Oliva C.L. (2002) Alcoholismo y comorbilidad psiquiátrica en una población de pacientes psiquiátricos y alcohólicos. *Psiquis* 11(4): 20-34.
- Rasmussen D.D., Bryant C.A., Boldt B.M., Colasurdo E.A., Levin N. y Wilkinson C.W. (1998) Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 789-801.
- Ray L.A y Hutchison K.E. (2004) A polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) and sensitivity to the effects of alcohol in humans. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28(12):1789-1795.

- Rees L.H., Cook D.M., Kendall J.W., Allen C.F., Kramer R.M., Ratcliffe J.G. y Knight R.A. (1971). A radioimmunoassay for rat plasma ACTH. *Endocrinology*. 89: 254-261.
- Roberts A.J., Gold L.H., Polis I., McDonald J.S., Filliol D., Kieffer BL. y Koob GF. (2001) Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25(9): 1249-1256.
- Roberts A.J., McDonald J.S., Heyser C.J., Kieffer B.L., Matthes H.W., Koob G.F. y Gold L.H. (2000) Mu-opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 1002-1008.
- Robinson D.L. y Carelli R.M. (2008) Distinct subsets of nucleus accumbens neurons encode operant responding for ethanol versus water. *Eur J Neurosci.* 28(9):1887-1894.
- Rodbard D. y Lewald J.E. (1970). Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data. *Acta Endocrinol; Suppl.* 147: 79-103.
- Rodríguez-Manzo G., Asai M. y Fernández-Guasti A. (2002) Evidence for changes in brain enkephalin content associated to male rat sexual activity. *Behav. Brain Res.* 131: 47-55.
- Roman-Vendrell C, Yu YJ. y Yudowski GA. (2012) Fast modulation of μ -Opioid receptor (MOR) recycling is mediated by receptor agonists. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print].
- Popp RL. y Erickson CK. (1998) The effect of an acute ethanol exposure on the rat brain POMC opiopeptide system. *Alcohol.* 16(2): 139-148.
- Ryan JW, Ryan US, Schultz DR, Whitaker C, Chung A. y Dorer F.E. (1975) Subcellular localization of pulmonary antiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem J.* 146(2): 497-499.
- Saland LC., Abeyta A., Frausto S., Raymond-Stintz M., Hastings CM., Carta M., Valenzuela CF. y Savage DD. (2004) Chronic ethanol consumption reduces delta-and mu-opioid receptor-stimulated G-protein coupling in rat brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28(1): 98-104.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.M. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandi C., Borrell J., y Guaza C. (1990) Administration of leu-enkephalin impairs the acquisition of preference for ethanol. *Psychopharmacology (Berl).* 100(3):350-354.
- Sandi C., Borrell J., y Guaza C. (1989) Beta-endorphin administration interferes with the acquisition and initial maintenance of ethanol preference in the rat. *Physiol. Behav.* 45(1): 87-92.
- Sarkar D.K., Kuhn P., Marano J., Chen C. y Boyadjieva N. (2007) Alcohol exposure during the developmental period induces beta-endorphin neuronal death and causes alteration in the opioid control of stress axis function. *Endocrinology.* 148(6): 2828-2834.

- Schaefer G.J., Richardson W.R., Bonsall L.W. y Michael R.P. (1988) Brain stimulation, self locomotor-activity and tissue concentrations of ethanol in male rats. *Drug Alcohol Depend.* 21: 67-75.
- Schulz R., Wüster M., Duka T., y Herz A. (1980) Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology (Berl)*, 68(3): 221-227.
- Schwartz J.C., Malfroy B., y de La Baume S. (1981) Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* 29(17): 1715-1740.
- Seizinger B.R., Bovermann K., Maysinger D., Holtt V. y Herz A. (1983) Differential effects of acute and chronic ethanol treatment on particular opioid systems in discrete regions of rat brain and pituitary, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18: 361-369.
- Sellers E.M., Higgins G.A. y Sobell M.B. (1992) 5-HT and alcohol abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(2): 69-75.
- Sephadex, Gel filtration in theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals (1977), Upplands Grafiska AB, Sweden.
- Soini S.L., Honkanen A., Hyytiä P., y Korpi E.R. (1999) [³H]ethylketocyclazocine binding to brain opioid receptor subtypes in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol.* 18(1): 27-34.
- Solhonne B., Gros C., Pollard H., y Schwartz J.C. (1987) Major localization of aminopeptidase M in rat brain microvessels. *Neuroscience* 22(1): 225-232.
- Spanagel R. y Weiss F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.* 22(11): 521-527.
- Spanagel R. (2003). Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice & Research.* 4: 507-518.
- Stinus L., Cador M. y Le Moal M. (1992) Interaction between endogenous opioids and dopamine within the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci.* 654: 254-273.
- Strand, L. Fleur. (1999) *Neuropeptides. Regulators of Physiological Processes.* Library of Congress, London, England
- Strother W.N., Chernet E.J., Lumeng L., Li T.K. y McBride W.J. (2001) Regional central nervous system densities of delta-opioid receptors in alcohol-preferring P, alcohol-nonpreferring NP, and unselected Wistar rats. *Alcohol.* 25(1): 31-38.
- Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1983) Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci.* 32: 197-204.

- Tabakoff B. y Hoffman P.L. (1996) Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron*. 16: 909-912.
- Tabakoff B., Urwyler S., Hoffman P.L. (1981) Ethanol alters kinetic characteristics and function of striatal morphine receptors. *J Neurochem*. 37(2): 518-521.
- Topel H. (1988) Beta-endorphin genetics in the etiology of alcoholism. *Alcohol*. 5(2): 159-165.
- Torregrossa M.M. y Kalivas P.W. (2008). Microdialysis and the neurochemistry of addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 90(2): 261-272.
- Turchan J., Przewłocka B., Toth G., Lasoń W., Borsodi A., y Przewłocki 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(3): 971-977.
- Ulm R.R., y Volpicelli L.A. (1995) Opiates and alcohol self-administration in animals. *Journal of Clinical Psychiatry*. 56(Suppl 7): 5-14.
- Van Ree J.M., Gerrits M.A. y Vandershuren L.J. (1999) Opioids, reward and addiction: an encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol. Rev*. 51: 341-396.
- Vats I.D., Chaudhary S., Sharma A., Nath M. y Pasha S. (2010) Rationally designed chimeric peptide of met-enkephalin and FMRFa-[D-Ala²,p-CI-Phe⁴]YFa induce multiple opioid receptors mediated antinociception and up-regulate their expression. *Eur. J. Pharmacol*. 638(1-3): 54-60.
- Vengeliene V., Bilbao A., Molander A. y Spanagel R. (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol*. 154: 299-315.
- Verhoef V.M., Wiegant D., y De Wied. (1982) Regional distribution of α - and γ -type endorphins in rat brain. *Brain Res*. 21: 454-460.
- Vescovi PP., Coiro V., Volpi R., Giannini A., y Passeri M. (1992) Plasma beta-endorphin, but not met-enkephalin levels are abnormal in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol*. 27(5): 471-475.
- Vindrola O., Briones R., Asai M. y Fernández-Guardiola A. (1981) Amygdaloid kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci. Lett*. 21: 39-43.
- Volpicelli J.R., Alterman A.I., Hashashida M. y O'Brien C.P. (1992) Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch. Gen. Psychiatry*. 49: 876-880.
- Wheeler RA, Carelli RM. (2009) Dissecting motivational circuitry to understand substance abuse. *Neuropharmacology*. 56 (Suppl 1):149-59.

Whilney, E. N., y Rolfes, S. R. (1996). An Overview of nutrition. En: Understanding nutrition. (7a ed.), Mineapolis, West Publishing Company, pp 1-30

Widdowson P.S. y Holman R.B. (1992). Ethanol-induced increase in endogenous dopamine release may involve endogenous opiates. *J. Neurochem.* 59: 157-163.

Wild K.D. y Reid L.D. (1990) Modulation of ethanol-intake by morphine: evidence for a central site of action. *Life Sci.* 47(14):PL49-54

Wise R.A. y Bozarth M.A. (1982) Action of drugs of abuse on brain reward systems: An update with specific attention to opiates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 17: 239–243.

Yanai J., Shaanani R. y Pick C.G. (1995). Altered brain sensitivity to ethanol in mice after MPTP treatment. *Alcohol.* 12(2): 127-30.

Yang, X., Horn, K. y Wand, G.S. (1998) Chronic ethanol exposure impairs phosphorylation of CREB and CRE-binding activity in rat striatum. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22, 382-390.