

Concentración y liberación *in vitro* de encefalinas en el cerebro de la rata sometida al etanol en forma crónica y aguda

Miguel Asai Camacho*
Gilberto Matamoros-Trejo*
Agustina Cano-Martínez*
Carlos Aramburo de la Hoz**

Summary

Alcoholism represents one of the most important problems in public health world-wide. Several research groups have studied in detail the mechanisms by which alcohol produces its intoxicating or sedative effects, however many questions remain to be answered.

In an attempt to explore whether the content of brain enkephalins is changed in alcoholism, we have studied the effects of acute and chronic ethanol exposure on Met- and Leu-enkephalin concentrations in amygdala, striatum, hypothalamus and hippocampus of rat brain. Also, we have studied the Met-enkephalin release from striatum slices in the same experimental models.

Male Wistar rats (250-300 g) housed in a temperature and light-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ with 12 hours of illumination starting at 06:00 h) were used.

The animals employed in the experiments with acute alcohol treatment (3.0 g/kg i.p.) were maintained on food and water *ad libitum*. In experiments involving chronic treatment with different dosages of ethanol (10, 15, 20 %), the animals drank the ethanol diluted in tap water as their sole source of liquid, plus food *ad libitum*. Controls were given water instead of ethanol over an identical period of time. Met- and Leu-enkephalins were assayed in triplicate by radioimmunoassay procedure.

Our results show that ethanol decreased the enkephalin content in almost all the regions analyzed in both the acute and chronic experiments. In both instances the changes are transitory and the brain enkephalins content recovers with time and inversely to the ethanol concentrations in blood.

The Met-enkephalin release from rat striatum did not change with respect to the control group, neither in acute nor in chronic treatment. However, we found a significant increase in Met-enkephalin when the measure was made two minutes after the ethanol injection. Ethanol is able to cross through the blood-brain barrier in seconds, and therefore, the cell membranes' perturbations can be extremely fast. When we measured the enkephalin release 20 or 80 minutes after the ethanol injection the release is similar to that in controls.

The effects of ethanol over enkephalins brain content and their release vary depending upon the type of peptide and the brain region studied. The possible explanations are discussed.

* Laboratorio de Análisis Químicos, División de Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 México, D.F.

** Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. C.P. 04510, México, D. F.

Resumen

A principios de siglo se estableció que el etanol altera la permeabilidad de la membrana a través de mecanismos inespecíficos. Recientemente, con el uso de técnicas muy sensibles como la Resonancia Paramagnética del Electrón, se ha podido establecer que dosis muy bajas de etanol incrementan la fluidez de la membrana. Se ha propuesto inclusive, la existencia de microdominios dentro de la membrana neuronal, con una sensibilidad particular al etanol.

Los cambios en la fluidez de la membrana, pueden manifestarse por la alteración de varios eventos bioquímicos intracelulares como la biosíntesis, la liberación o la degradación de varios neurotransmisores y proteínas. El contenido de las encefalinas se modifica en el cerebro de la rata después de la administración aguda y crónica de varios fármacos, como el pentilene-tetrazol, lidocaína y morfina.

En el presente trabajo se estudió el efecto del etanol, administrado en forma crónica y aguda, sobre la concentración de encefalinas, por medio de la técnica de radioinmunoensayo, en amígdala, cuerpo estriado, hipotálamo e hipocampo de la rata; así como la liberación *in vitro* de Met-encefalina (ME) a partir de rebanadas del cuerpo estriado en los mismos modelos experimentales.

Un grupo de animales fue sometido al etanol crónico, mediante la ingesta de una mezcla de etanol-agua al 5, 10 y 20% (v/v), como única fuente de líquidos, con 15 días de duración en cada una de las dosis. En el grupo de ratas sometido al experimento agudo, éstas se inyectaron con etanol por vía intraperitoneal a una dosis de 3 g/kg y se sacrificaron a los 10, 20, 40 y 80 minutos después de la inyección. La liberación *in vitro* de Met-encefalina, se realizó en los mismos modelos experimentales.

Los resultados del presente trabajo muestran que en el etanol crónico, la concentración de encefalinas disminuye de manera significativa en todas las estructuras analizadas, excepto en el hipocampo, en donde la Leucina Encefalina (LE) no sufre modificaciones. En el modelo agudo, también encontramos una reducción del contenido de encefalinas, pero la respuesta fue diferente en función del péptido, estructura y tiempo analizado. A los 10 minutos después de la inyección con etanol la LE disminuye su concentración en todas las estructuras, excepto en el hipocampo, en donde nuevamente no tiene cambios. En el mismo tiempo la ME sólo se reduce en la amígdala y en el hipocampo, en el cuerpo estriado el efecto es tardío y se presenta hasta los 20 minutos. La liberación *in vitro* de ME no tiene cambios con respecto a su control, tanto en el modelo crónico como en el agudo, a los 20 y 80 minutos de la inyección con etanol. La liberación de ME sólo se incrementó significativamente, 2 minutos después de inyectado el etanol. Los mecanismos a través de

los cuales el etanol puede modificar el contenido y liberación de encefalinas, son discutidos.

Introducción

Los depresores no específicos del Sistema Nervioso Central (SNC), disminuyen la excitabilidad neuronal (38). Sin embargo las poblaciones neuronales específicas requieren de una concentración particular del depresor para alterar sus funciones de membrana (39). El etanol está clasificado dentro de este grupo. Este fármaco, como propuso Meyer (27) desde principio de siglo, modifica las propiedades fisiológicas de las membranas neuronales a través de mecanismos inespecíficos. Esta "hipótesis de membrana" fue ampliamente aceptada durante varias décadas. En los últimos años, métodos fisicoquímicos muy sensibles como la Resonancia Paramagnética del Electrón (RPE), han podido establecer que dosis muy bajas de etanol (25-100 mM), incrementan en forma significativa la fluidez de la membrana. Este efecto se correlaciona con el efecto sedante producido por el etanol (5,6,16).

Las membranas neuronales están compuestas por mezclas heterogéneas de lípidos y proteínas, por lo cual se pueden producir áreas de sensibilidad diferencial al etanol y dar lugar a "microdominios" dentro de la estructura de membrana, con una composición particular de lípidos y proteínas. Los lípidos más importantes que conforman la membrana celular de las neuronas (como los gangliósidos, fosfolípidos y colesterol), contribuyen a determinar la sensibilidad de la membrana al etanol. Cuando se añaden los gangliósidos a preparaciones de bicapas con fosfolípidos, se incrementa la fluidez de membrana (15).

La localización de regiones específicas dentro de la estructura de membrana que tienen una particular sensibilidad al etanol, sugiere la existencia de proteínas unidas a éstas (7), las cuales, para manifestar su actividad óptima, dependen de los lípidos que las rodean. Así, las proteínas pueden ser selectivamente sensibles al etanol (10). En consecuencia, la respuesta de receptores ionóforos y enzimas en conjunto, pueden dar lugar a los cambios neurofarmacológicos debidos al etanol.

Estos efectos se manifiestan, en primera instancia, cuando se modifican algunas propiedades bioquímicas de las neuronas, como son la biosíntesis, la liberación y la degradación de algunos neurotransmisores (21,25). Más aún, se ha descrito que el etanol interfiere con la síntesis de péptidos neuronales (8) y con la incorporación de aminoácidos a la síntesis proteínica a nivel del aminoacil-ARN_t (11). Los péptidos opioides presentan cambios de concentración tisular como consecuencia de la administración aguda y crónica de diferentes fármacos (18, 19, 32, 40). Blum y col. (3) han vinculado al etanol con los opioides. Después de la exposición crónica con etanol en el hamster, la Leucina-Encefalina (LE) disminuye su concentración en los ganglios basales. Los cambios no sólo se reflejan en las encefalinas. En la rata, después de ser sometida al etanol crónico y agudo, la β -endorfina, la dinorfina y la α -neo-endorfina, modifican su contenido en diversas

estructuras del cerebro y de la hipófisis (37). El etanol al interactuar con los receptores opiáceos, altera el enlace de los opiáceos alcaloides como de los péptidos opioides. Al ser añadido a preparaciones de membrana, inhibe en forma significativa la unión de las encefalinas a su receptor (17). Esta inhibición es selectiva; los receptores δ disminuyen la capacidad de unión por su ligando específico, en tanto que los receptores μ no presentan cambios (20). Si los receptores opiáceos pierden la capacidad de unir a su ligando selectivamente, aun de manera transitoria (17), se puede alterar la síntesis de los péptidos opioides, su liberación, degradación o la combinación de varios de estos eventos bioquímicos.

El presente trabajo estudia el efecto del etanol administrado en forma aguda y crónica, sobre la concentración de encefalinas, en la amígdala, cuerpo estriado, el hipotálamo y el hipocampo de la rata, así como la liberación *in vitro* de Met-encefalina (ME), del cuerpo estriado en los mismos modelos experimentales.

Material y métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 250-300 grs de peso, las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura e iluminación ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, con 12 horas de iluminación comenzando a las 06:00 a.m.); el agua y el alimento para los animales control fue proporcionado *ad libitum*. Cada una de las ratas control y las experimentales se pesaron y agruparon al azar en cajas de acrílico, con un total de 5 animales por caja.

Administración crónica de etanol

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

Se evaluó diariamente la cantidad de etanol ingerido (reportado en gramos), y el peso corporal de las ratas cada 15 días. Una caja control (sin ratas) fue manipulada igual a las demás para conocer la pérdida de líquido por el movimiento. La pérdida promedio fue de 5 ml y se sustrajo al valor del volumen ingerido por el resto de las cajas experimentales.

Administración aguda de etanol

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

Liberación in vitro de encefalinas

En los experimentos de liberación *in vitro* se utilizaron a los animales sometidos al etanol en forma crónica al 20% y aguda, sacrificados a los 20 y 80 min. después de la inyección. El cuerpo estriado de estas ratas se disectó rápidamente, grupos de 3 estriados cada uno, se rebanaron en 2 direcciones a 90° y a intervalos de 300 micras con un rebanador de tejido (Brinkman Tissue Choper). Las rebanadas resultantes se incubaron durante 15 min. en 25 ml de amortiguadores Krebs-bicarbonato a 37°C saturado con una mezcla de O₂/CO₂ 95/5%. La composición del medio Krebs-bicarbonato fue (mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, Glucosa 10. Las rebanadas fueron perfundidas con el medio Krebs-bicarbonato oxigenado, con un flujo de 1 ml/min. Después de un lavado preliminar de 15 min., las rebanadas fueron perfundidas durante 20 min., en seguida se perfundieron 10 min. con un medio de alta concentración de potasio (22 mM). Los experimentos se realizaron simultáneamente con 4 cámaras de perfusión en las mismas condiciones (3 estructuras en cada una, 2 cámaras con tejido control y 2 con tejido experimental). Los experimentos de liberación de Met-encefalina en animales tratados en forma crónica y aguda con etanol, se llevaron a cabo en presencia del dipéptido fen-ala a una concentración 1 mM, el cual ha mostrado inhibir la acción de la encefalinas (30,46). En cada uno de los experimentos, tanto las rebanadas perfundidas como los perfusados se hirvieron en 10 vol. de HCl 0.1 N durante 15 min. para inactivar a las enzimas digestivas aún activas, en presencia del inhibidor y se congelaron a -20°C hasta la posterior cuantificación de encefalinas.

Cuantificación de etanol en sangre

Después de la decapitación se recolectó la sangre del tronco de la rata y se obtuvo el suero por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. La cantidad de etanol en el suero, se evaluó con la curva patrón para etanol en sangre (332 UV de Sigma Chemical Co).

El cuerpo estriado, el hipocampo y el hipotálamo fueron disectados de acuerdo a los parámetros descritos por Glowinsky e Inversen (13) y del Atlas de

Koning y Klippel (24). La disección de la amígdala se realizó de acuerdo al procedimiento de Engel y col. (9).

Cuantificación de encefalinas

El tejido fue pesado y los perfusados inactivados en 10 vol. de HCl 0.1 N a 95°C durante 15 min., enfriado en baño de hielo, el tejido fue homogeneizado y centrifugado a 50,000 × g a 4°C, durante 60 min. El sobrenadante y los perfusados se purificaron mediante cromatografía en columna con Amberlita XAD-2 a un flujo de 0.5 ml/min. El contenido de encefalinas se cuantificó por la técnica de radioinmunoensayo (RIA). Las muestras fueron procesadas por triplicado utilizando anticuerpos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (41). Los datos se expresan como pmol de inmunoreactividad (IR-encefalina/g de peso húmedo).

Resultados

La tabla 1 muestra la variación del peso corporal y la cantidad en gramos de etanol ingerido por las ratas durante el alcoholismo crónico. Los animales control aumentaron de peso durante los 45 días del experimento, los animales con etanol crónico no mostraron ese aumento durante el mismo tiempo. La cantidad de etanol ingerido por las ratas fue en aumento conforme se incrementó la dosis de etanol.

Al término del experimento crónico (tabla 2), la cantidad de encefalinas en todas las estructuras analiza-

TABLA 1
Variación del peso corporal y etanol ingerido por las ratas sometidas al etanol en forma crónica

Dosis	Peso corporal (gr.)		Etanol ingerido (gr.)
	Control*	Experimental	Experimental*
5 %	314 ± 4	385 ± 6	6.8 ± 0.2
10%	383 ± 6	397 ± 7	9.1 ± 0.5
20 %	412 ± 7	385 ± 8	10.9 ± 0.6

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

* ANOVA p < 0.001

TABLA 2
Concentración de Met- y Leu-encefalina en el cerebro de la rata tratada en forma crónica con etanol

Estructura	Met-encefalina		Leu-encefalina	
	Control	Etanol	Control	Etanol
Amígdala	317 ± 12	229 ± 11*	92 ± 4	51 ± 3**
Estriado	1834 ± 113	777 ± 20*	336 ± 22	192 ± 22*
Hipotálamo	724 ± 70	352 ± 30*	241 ± 12	120 ± 6**
Hipocampo	95 ± 13	50 ± 2*	21 ± 2	17 ± 2

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

* p < 0.002; ** p < 0.001

TABLA 3
Concentración de Met-enkefalina cerebral en el tratamiento agudo con etanol

Estructura	Control	10 min.	20 min.	40 min.	80 min.
Amígdala	380 ± 30	219 ± 11*	254 ± 19	297 ± 28	409 ± 22
Estriado	2108 ± 120	1775 ± 127	1351 ± 70**	1402 ± 147	1745 ± 168
Hipotálamo	778 ± 55	628 ± 30	613 ± 31	671 ± 47	741 ± 46
Hipocampo	115 ± 12	48 ± 6*	58 ± 2*	61 ± 2*	66 ± 7*
Etanol en sangre (mg/dl.)	—	429 ± 15	377 ± 3	367 ± 9	336 ± 7

Cada valor es el promedio de 9-10 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de t-Student. Las concentraciones se expresan como pmol IR-Met-enkefalina/gr. de peso, con una dosis de etanol de 3 gr/kg. La concentración de etanol en el momento del sacrificio se expresa como mg/dl de suero.

* p < 0.005; ** p < 0.001 con respecto al control.

TABLA 4
Concentración de Leu-enkefalina cerebral en el tratamiento agudo con etanol

Estructura	Control	10 min.	20 min.	40 min.	80 min.
Amígdala	132 ± 6	76 ± 3**	91 ± 5**	113 ± 6	138 ± 11
Estriado	321 ± 31	125 ± 8**	193 ± 11*	164 ± 4**	265 ± 9
Hipotálamo	240 ± 7	197 ± 5*	173 ± 4**	238 ± 4	237 ± 8
Hipocampo	52 ± 2	61 ± 0.8	59 ± 1	53 ± 1	51 ± 1

Cada valor es el promedio de 9-10 ratas ± S.E.M. Los niveles de significancia fueron calculados usando la prueba de t-Student. Las concentraciones se expresan como pmol IR-Leu-enkefalina/gr. de peso, con una dosis de etanol de 3 gr/kg. Los valores de la concentración de etanol en el momento del sacrificio se muestran en la tabla 3.

* p < 0.005; ** p < 0.001 con respecto al control.

das, resultó significativamente menor con relación a su control, excepto en el hipocampo en donde la LE no presenta cambios. La cantidad de etanol en sangre fue de 81 ± 10 mg/dl. A un grupo de ratas se le sacrificó 24 horas después de retirado el etanol, el cual ya no se detectó en sangre y la concentración de encefalinas fue similar al grupo control (los datos no se muestran).

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

El etanol reduce la cantidad de ME en amígdala y el cuerpo estriado a los 10 y 20 min. respectivamente y regresa a valores similares al control 80 min. después. En el hipocampo el contenido de ME desciende desde los primeros 10 min., pero no recupera el valor control aun después de transcurridos 80 min. La ME en el hipotálamo no presenta cambios (tabla 3). El otro péptido, la LE, disminuye su concentración en forma significativa en todas las estructuras analizadas, antes de 10 min., sin embargo en el hipocampo no cambia.

Los resultados anteriores muestran un rasgo general: el etanol disminuye temporalmente la concentración tisular de encefalinas, tanto en el modelo crónico como en el agudo, sin embargo, recuperan su valor control en función del tiempo. Este efecto transitorio

permite sugerir que las encefalinas son liberadas de sus terminales nerviosas para dar lugar a un rápido recambio.

En el paradigma crónico, la liberación *in vitro* de ME a partir de rebanadas del cuerpo estriado, es similar con respecto a su control (Fig. 1). Durante la exposición aguda al etanol, se observa un dato inverso al

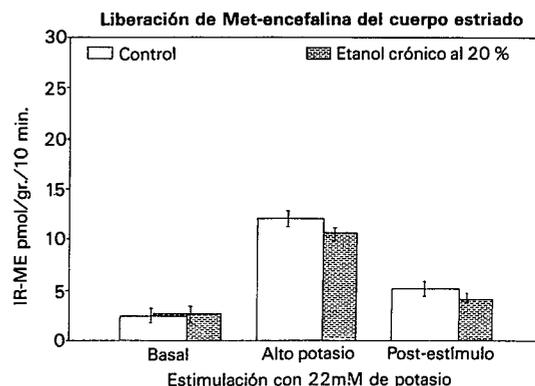


FIGURA 1. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales fueron sacrificados al término del experimento crónico con etanol. En el momento del sacrificio la concentración de etanol en agua era del 20% (v/v). Las muestras se recolectaron a intervalos de 10 minutos. Los valores se reportan como pmol/g/10 min. El experimento se realizó 2 veces (n = 6). La estadística aplicada fue la prueba de t-Student para muestras pareadas.

esperado, es decir, mientras que en el tejido la menor cantidad de ME se presenta a los 20 min. (tabla 3), su liberación no cambia con respecto al control (Fig. 2). La liberación tampoco se modifica después de transcurridos 80 min. (Fig. 3).

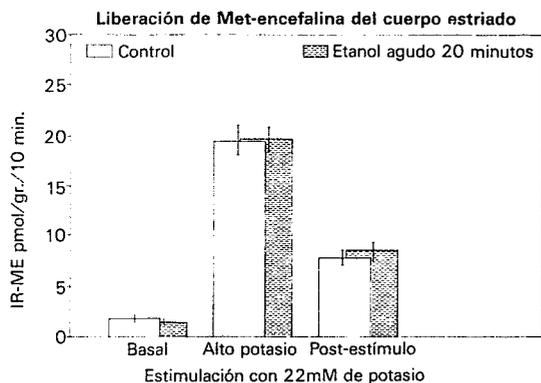


FIGURA 2. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 20 minutos después de la inyección i.p. de etanol a una dosis de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol/g/10 min. El experimento se realizó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

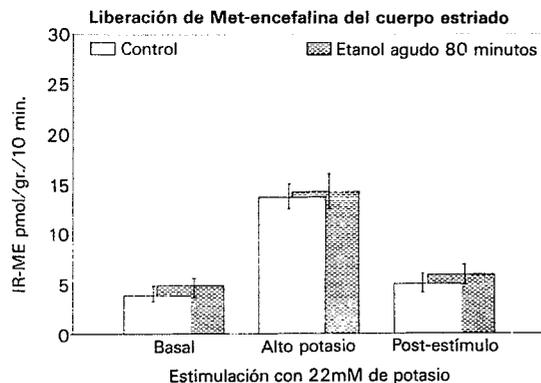


FIGURA 3. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 80 minutos después de la inyección con etanol por vía i.p. de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol/g/10 min. El experimento se realizó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

El único cambio observado en la liberación de ME, se realiza 2 minutos después de inyectado el etanol, momento en el cual incrementa de manera significativa la liberación del péptido (Fig. 4). La significancia del análisis de varianza de 2 vías para las encefalinas y en función del tiempo en el experimento agudo se muestran en la tabla 5.

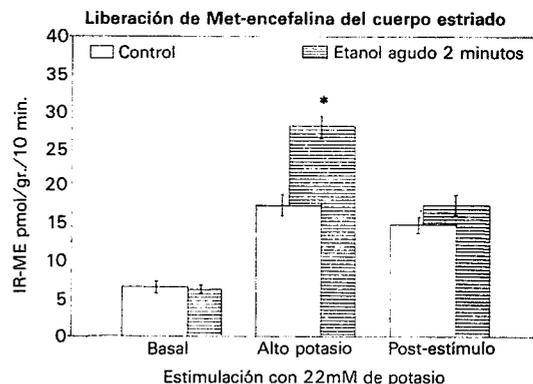


FIGURA 4. Liberación de Met-enkefalina a partir de rebanadas del cuerpo estriado, con un estímulo despolarizante de 22 mM de potasio. Los animales se sacrificaron 2 minutos después de una inyección con etanol por vía i.p. de 3 g/kg. Los valores se reportan como pmol/g/10 minutos. El experimento se realizó 2 veces (n = 6). La significancia se realizó usando la prueba de t-Student para muestras pareadas * $p < 0.01$.

Discusión

El presente trabajo demuestra claramente la alteración del etanol, administrado en forma aguda y crónica, sobre la concentración de encefalinas en casi todas las estructuras analizadas, así como en la liberación de ME a partir de rebanadas del cuerpo estriado.

Los animales que ingirieron etanol durante 45 días (tabla 1), no aumentaron su peso corporal, los animales control incrementaron su peso en forma significativa durante el mismo periodo. Este efecto es consistente con el grupo de Bitsh y col. (1), quienes reportan que el consumo prolongado de etanol induce a una deficiencia de tiamina a pesar de ser suministrada en la dieta.

El tratamiento con etanol en forma crónica, a dosis de 5, 10, 20% (v/v), como única fuente de líquidos y

TABLA 5
Análisis de varianza de 2 vías aplicado a cada estructura y péptido. Los valores de F y P se obtuvieron de 12 animales de 5 grupos (control, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 80 minutos)

Estructura	Encefalinas		Tiempo	
	F	(1.90)	F	(4.90)
Amígdala	233.9	P < 0.000	9.78	P < 0.000
Estriado	747.7	P < 0.000	11.05	P < 0.000
Hipotálamo	1245.3	P < 0.000	10.49	P < 0.000
Hipocampo	74.0	P < 0.000	46.47	P < 0.000

con 15 días de duración en cada una de ellas, disminuye en forma significativa la concentración de encefalinas en todas las estructuras analizadas excepto en el hipocampo en donde el contenido de LE no se modifica. Esta reducción puede ser consecuencia de la interferencia del etanol con la síntesis proteínica, ya sea con la incorporación de aminoácidos (28), o con la inhibición de la aminoacil-ARNt-sintetasa (11), los autores reportan una inhibición progresiva a medida que aumenta la concentración de etanol y el tiempo de exposición. Efectos de esta naturaleza han sido señalados para proteínas del sistema opioide. En el lóbulo intermedio de la hipófisis de rata, la incorporación de ³H-fen a la síntesis de β-endorfina se reduce un 30% cuando los animales son expuestos al etanol en forma crónica (37).

Los cambios se revierten cuando se suspende la ingesta de etanol. Estos datos son consistentes con los señalados por Schulz y col. (36). Estos autores encuentran disminuidos los valores de ME en el cuerpo estriado y cerebro medio de la rata, sin embargo, reportan la recuperación total de ME, 6 días después. Es probable que la diferencia en el tiempo se deba a que su medición se realizó hasta los 6 días de retirado el etanol. Es necesario señalar que la velocidad de conversión del etanol en acetaldehído se realiza en términos de horas y no de días (4).

La disminución de LE y ME en el estriado, estructura involucrada en los mecanismos de locomoción en respuesta al tratamiento en forma crónica, puede estar mediada por la estimulación del etanol sobre el sistema dopaminérgico en la actividad nigroestriatal, ya que la dopamina inhibe tónicamente la síntesis y liberación de ambos péptidos (2,14,22,42).

La administración de etanol en forma aguda disminuye la concentración de encefalinas en forma inmediata, y la respuesta es diferente en función de la estructura y tiempo analizado. En los primeros 10 minutos posteriores a la inyección de etanol, la concentración de LE se reduce de manera significativa en todas las estructuras analizadas, excepto en el hipocampo, en donde no se presentan cambios. Al mismo tiempo, la cantidad de ME se reduce significativamente en la amígdala e hipocampo. El efecto en el cuerpo estriado es tardío y se manifiesta a los 20 minutos, el hipotálamo no modifica el contenido de ME a lo largo del experimento. Sin embargo, en función del tiempo y de forma inversa a la cantidad de etanol circulante, las concentraciones de encefalinas en las estructuras afectadas retornan a un valor semejante al control, 80 minutos después del estímulo con etanol.

Es probable que algunos efectos causados por el etanol sean debidos al producto de su degradación, el acetaldehído, molécula inclusive más tóxica que el etanol (4,8). Los datos concernientes al papel de acetaldehído son contradictorios. La inhalación incrementa su concentración y produce dependencia física, con un alto grado de tolerancia cruzada con el etanol. Por otro lado el pirazol, potente inhibidor de la deshidrogenasa alcohólica, potencia los efectos crónicos y agudos del etanol (8).

La recuperación de encefalinas en un tiempo tan corto, puede ser consecuencia de su recambio a partir

de precursores putativos de bajo peso molecular, presentes en la terminal sináptica, como el heptapéptido y el octapéptido, moléculas ampliamente distribuidas en el SNC (29,35,43,44,45). Los experimentos de liberación de ME en el modelo crónico, no muestra cambios con respecto a su control. Este resultado pudiera deberse a que el etanol alterase la síntesis de proteínas y no el mecanismo de liberación (28). En el modelo agudo, los datos de la tabla 3 muestran un descenso significativo de ME en el cuerpo estriado a los 20 minutos, y una recuperación a los 80 minutos posteriores a la inyección de etanol. Las cantidades liberadas en ambos tiempos son similares al control. Una posible explicación es que el efecto del etanol es inmediato, su paso a través de la barrera hematoencefálica alcanza las membranas neuronales en segundos (3,7). Así, las mediciones a los 20 y 80 minutos pueden resultar posteriores al efecto causado por el etanol en las membranas y por lo tanto la liberación en esos momentos sea similar al control.

Cuando medimos la liberación a un tiempo más corto después de la inyección con etanol, es decir a los 2 minutos (ya se observan cambios conductuales), encontramos un incremento significativo en la liberación de ME con respecto a su control. Otros autores han encontrado que la liberación de β-endorfina del lóbulo anterior de la hipófisis se incrementa después del tratamiento con etanol. Este fármaco estimula la liberación del Factor Liberador de la Corticotropina (CRF) de las neuronas hipotalámicas y aumenta la liberación y síntesis de ACTH, β-LPH y β-endorfina (12).

El rápido efecto del etanol en la liberación de ME puede deberse a un mecanismo mediado en la membrana citoplásmica y no a la interferencia del etanol en la síntesis de proteínas, proceso más lento que requeriría de más tiempo para manifestarse. El posible mecanismo de acción en membrana, además de ser muy rápido también sería selectivo. El etanol actúa preferencialmente sobre determinadas áreas de la membrana, con un alto grado de selectividad. Esta selectividad puede ser resultado de la heterogeneidad de la membrana (diferente composición de lípidos) y de las características de la membrana en diferentes células u organelos. Existe un tipo de proteínas unidas a membrana que, de acuerdo a la estructura en donde se encuentren, son muy sensibles a bajas concentraciones de etanol. El ejemplo mejor estudiado es la enzima adenilatociclasa (26). Esta enzima está vinculada a la función de varios neurotransmisores en el SNC y juega un papel clave en la transmisión sináptica. El etanol aumenta la actividad de la adenilato-ciclasa cerebral y en presencia de nucleótidos de guanina, concentraciones muy bajas de etanol, incrementa la actividad de la enzima (26). Sin embargo, existe una diferencia importante, que puede explicar la respuesta del etanol a nivel de la membrana de diferentes estructuras. La actividad de la enzima se altera en función de la estructura en la cual esté integrada. El complejo dopamina-receptor-adenilato ciclasa en el cuerpo estriado, presenta un solo sitio de acción para el etanol, al interferir con la proteína G y la unidad catalítica (33). El mismo complejo para la norepinefrina en la corteza cerebral presenta múltiples sitios de acción (34).

La interacción del etanol con los receptores opiáceos es otro ejemplo de especificidad. Existe un gran número de subtipos de receptores opiáceos con diferente afinidad por su ligando endógeno. Los receptores δ tienen mayor afinidad por la LE y son particularmente sensibles al etanol, el etanol disminuye la afinidad del ligando por el receptor (23), sin embargo, el receptor κ es muy resistente al efecto del etanol (31). La distribución de ambos receptores es diferente, los receptores δ se encuentran distribuidos principalmente en estructuras como amígdala, estriado, hipocampo y septum. Los receptores κ , se ubican en sustancia gris periacueductal y tallo cerebral.

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

Agradecimiento

Los autores agradecen al Dr. Rafael Salín y al M. en C. Rafael Gutiérrez sus valiosas críticas para la elaboración de este trabajo. Al Sr. Gabriel Linares y a la Sra. Carmen Navarro por su ayuda técnica. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el CONACYT clave P22COOX88172.

REFERENCIAS

1. BITSH R, HANSEN J, HOTZEL D: Thiamine metabolism during long-term alcohol administration. 2. Ethanol induced changes at suboptimal thiamine supply. *J Int Vitam Nutr*, 52:253-259, 1982.
2. BLUM K, BRIGGS AH, ELSTON SFA, DELLALLO L, SHRIDAN PJ: Reduced leucine-enkephalin-like immunoreactive substance in hamster basal ganglia after long-term ethanol exposure. *Science*, 216:1425-1426, 1982.
3. BLUMM K, HAMILTON MG, WALLACE JE: Alcohol and opiates: A review of common neurochemical and behavioural mechanisms. En: K Blumm (Eds). *Alcohol and Opiates*. Raven Press, Nueva York, 203-233, 1977.
4. CAVEY CV: Alcoholism-A biological approach. *Trends in Neurosci*, 2:23-25, 1979.
5. CHIN JH, GOLDSTEIN DB: Drug tolerance in biomembranes: A spin label study of the effects of ethanol. *Science*, 196:684-685, 1976.
6. CHIN JH, GOLDSTEIN DB: Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes. *Mol Pharmacol*, 13:435-441, 1977.
7. CHIN JH, GOLSTEIN DB: Membrane-disordering action of ethanol variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. *Mol Pharmacol*, 19:425-431, 1981.
8. ELLINGBOE J: Effects of alcohol on neurochemical processes. En: AM Lipton, A DiMascio, KF Killan (Eds). *Psychopharmacology: A Generation of Progress*. Raven Press, Nueva York, 1653-1664, 1978.
9. ENGEL J, SHARPLESS NS: Long-lasting depletion of dopamine in rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Res*, 136:381-386, 1977.
10. FARIAS RN, BLOJ B, MORERO RD, SINERZ F, TRUCCO RE: Regulation of allosteric membrane-bound enzymes through changes in membrana lipid composition. *Biochem Biophys Acta*, 415:231-251, 1975.
11. FLEMING EW, TEWARI S, NOBLE EP: Effects of chronic ethanol ingestion on brain aminoacyl-tRNA synthetases and tRNA. *J Neurochem*, 24:553-560, 1975.
12. GIANULAKIS C, BARCOM A: Effect of acute ethanol in vivo and in vitro on the β -endorphin system in the rat brain. *Life Sci*, 40:19-28, 1987.
13. GLOWINSKY J, IVERSEN LL: Regional studies of catecholamines in rat brain. *J Neurochem*, 13:655-669, 1966.
14. GRIFFITHS PJ, LITTLETON JM, ORTIZ A: Changes in monoamine concentrations in mouse brain associated with ethanol dependence and withdrawal. *Br J Pharmacol*, 51:307-309, 1974.
15. HARRIS RA, GROH GI, BAXTER DM, HITZEMAN RJ: Gangliosides enhance the membrane actions of ethanol and pentobarbital. *Mol Pharmacol*, 25:410-417, 1984.
16. HARRIS RA, SCHROEDER F: Ethanol and the physical properties of brain membranes: fluorescence studies. *Mol Pharmacol*, 20:128-137, 1981.
17. HILLER JM, ANGEL LM, SIMON EJ: Multiple opiate receptors: Alcohol selectively inhibits binding to delta receptors. *Science*, 214:468-469, 1981.
18. HOLT V, PRZEWLOCKI R, HERZ A: β -endorphin like immunoreactivity in plasma, pituitary and hypothalamus of rats following treatment with opiates. *Life Sci*, 23:1057-1066, 1978.
19. HONG JS, YANG H, FRATTA W, COSTA E: Rat striatal methionine-enkephalin content after chronic treatment with cataleptogenic and noncataleptogenic antischizophrenic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 205:141-147, 1978.
20. HYNES MD, LOCHNER MA, KERR GB, HYMSON DL: Chronic ethanol alters the receptor binding characteristics of the delta opioid receptor ligand, D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin in mouse brain. *Life Sci*, 33:2331-2337, 1983.
21. KALANT H: Direct effects of ethanol on the nervous system. *Fed Proc*, 34:1930-1941, 1975.
22. KAROUM F, WYATT RJ, MAJCHROWICZ E: Brain concentrations of biogenic amine metabolites in acutely treated and ethanol-dependent rats. *Br J Pharmacol*, 56: 403-411, 1976.
23. KHATAMI S, PAULA L, HOFFMAN T, SHIBUYA T, SALAFSKY B: Selective effects of ethanol on opiate subtypes in brain. *Neuropharmacol*, 26:1503-1508, 1987.
24. KONING JFR, KLIPPEL RA: *The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1963.
25. LILJEQUIST S, CARLSSON A: Alteration of central catecholamine following acute administration of ethanol. *J Pharm Pharmacol*, 30:728-730, 1978.
26. LUTHIN GR, TABAKOFF B: Activation of adenylate cyclase by alcohols requires the nucleotide-binding protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 228:579-587, 1984.
27. MEYER HH: The addictive states. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, 46:338-346, 1901.
28. NOBLE EP, TEWARI S: Ethanol and brain ribosomes. *Fed Proc*, 34:1942-1947, 1975.
29. PATEY G, CUPO A, CHAMINADE M, MORGAT JL, ROSSIER J: Release of the heptapeptide Met-enkephalin-arg-phe and of the octapeptide Met-enkephalin-arg-gly-leu from rat striatum in vitro and their rapid inactivation. *Life Sci*, 33:117-120, 1983.
30. PATEY G, DE LA BAUME S, SCHWARTZ JC, GROS C, ROQUES B, FOURNIE-ZALUSKY MC, SOROCA-LUCAS E: Selective protection of methionine enkephalin release from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science*, 212:1153-1155, 1981.
31. PFEIFFER A, HERZ A: Discrimination of three opiate receptor binding sites with the use of a computerized curve fitting technique. *Mol Pharmacol*, 21:266-271, 1982.

32. PRZEWLOCKI R, HOLT V, DUKA TH, KLEBER G, GRAMSH C, HARMANN I, HERZ A: Long-term morphine treatment decreases endorphin levels in rat brain and pituitary. *Brain Res*, 174:357-361, 1979.
33. RABIN RA, MOLINOFF PB: Activation of adenylate cyclase by ethanol in mouse striatal tissue. *J Pharmacol Exp Ther*, 216:129-134, 1981.
34. RABIN RA, MOLINOFF PB: Multiple sites of action of ethanol on adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*, 227:551-556, 1983.
35. ROSSIER J, AUDIGIER Y, NICHOLAS L, CROS J, UDEN-FRIEND S: Met-enkephalin-arg-phe, present in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. *Nature*, 288:88-90, 1980.
36. SCHULZ R, WUSTER M, DUKA T, HERZ A: Acute and chronic ethanol treatment changes endorphin levels in brain and pituitary. *Psychopharmacology*, 68:221-227, 1980.
37. SEIZINGER BR, HOLLT V, HERZ A: Effects of chronic ethanol treatment on the in vitro biosynthesis of Pro-Opiomelanocortin and its posttranslational processing to β -endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *J Neurochem*, 43:607-613, 1984.
38. SMITH CM: The pharmacology of sedative hypnotics, alcohol and anesthetics: *Sites and Mechanisms of Action*. Springer, Heidelberg, 413-587, 1977.
39. STAIMAN A, SEEMAN P: The impulse blocking concentrations of anesthetics, alcohols, anticonvulsants, barbiturates and narcotics on phrenic and sciatic nerves. *Can J Physiol Pharmacol*, 52:535-540, 1974.
40. VINDROLA O, ASAI M, ZUBIETA M, LINARES G: Brain content of immunoreactive leu-enkephalin and met-enkephalin after pentylenetetrazol-induced convulsions. *Brain Res*, 90:85-89, 1983.
41. VINDROLA O, BRIONES R, ASAI M, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: Amygdaloid kindling enhances the met-enkephalin and leu-enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett*, 21:39-43, 1981.
42. WAJDA JI, MAGNIGALT I, HUDIEK P: Dopamine levels in the striatum and the effect of alcohol and reserpine. *Biochem Pharmacol*, 26:653-655, 1977.
43. WILLIAMS RG, DOCKRAY GJ: Differential distribution in rat basal ganglia of Met-enkephalin and Met-enkephalin-arg-phe peptides reveals by immunohistochemistry. *Brain Res*, 240:167-170, 1982.
44. YANG HY, PANULA P, TANG J, COSTA E: Characterization and location of met-enkephalin-arg-phe stored in various rat brain regions. *J Neurochem*, 40:969-976, 1983.
45. ZAMIR N, PALKOVITS M, BROWNSTEIN M: Distribution of immunoreactive Met-enkephalin-arg-gly-leu and Leu-enkephalin in discrete regions of the rat brain. *Brain Res*, 326:1-8, 1985.
46. ZUBIETA M, VINDROLA O, TALAVERA E, ASAI M, MASSARINI A, LINARES G: Pentylenetetrazol induced seizure produce and increase release of IR-Met-enkephalin from rat striatum in vitro. *Brain Res*, 360:101-107, 1985.