



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Efecto del tratamiento intermitente con Naltrexona en
el consumo voluntario de alcohol en rata macho.

Tesis
que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)

presenta

Eliana Barrios De Tomasi

Comité tutelar

Dr. Jorge Juárez González (Director)

Dra. Marisela Hernández González

Mtro. Sergio Meneses Ortega

Guadalajara, Jalisco

Mayo de 2005

A mis hijos Michelle y Andrei por que los amo, por ser mi motivo y fuerza para vivir y por su paciencia en estos años de estudio.

A mis padres Andrés y Graciela por todo el amor que me brindaron siempre y ser mis guías en este camino.

A mis hermanas Jorgelina y Teresa, por ser mis mejores amigas y con las que sé, siempre puedo contar, por su apoyo y buenos consejos.

A Toño, Frank, Santi, Rodri, Hannemie por siempre estar presente y por los agradables momentos que paso con ustedes.

A Cristy y Mary por su apoyo incondicional, por las largas pláticas y por estar en las buenas y malas tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al Dr. Jorge Juárez por ser un gran maestro en el camino de la investigación, por su paciencia y confianza y finalmente ayudarme a realizar este sueño. Mil gracias.

A la Dra. Marisela Hernández por su gran ayuda y por las charlas más allá de lo académico.

Al Mtro. Sergio Meneses por su amistad, por sus comentarios y sus chascarrillos en los momentos menos esperados.

A la Dra. Julieta Ramos por traerme a este instituto, trasmitirme sus conocimientos y su amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Guevara por todas sus enseñanzas y los buenos momentos de pláticas.

A Paty, Diana, Leopoldo, Claudia A, Olga, Carmen, Humberto, Sara, Lucía P, por su amistad y ayuda y por que día a día compartimos este espacio.

A todos los profesores, Dra. Esmeralda Matute, Dr. Emilio Gumá, Dr. Andrés González, Dr. Víctor M. Alcaraz, por sus conocimientos brindados para la realización de la maestría.

¡Gracias! a todos por apoyarme en este sueño hecho realidad.

Con cariño

Eliana

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	
Definición de alcoholismo	6
Intoxicación aguda y crónica	7
Metabolismo del alcohol	8
Farmacología del alcohol	9
Definición de sustancias opioides	10
Relación entre el alcoholismo y los sistemas neuroquímicos	12
La Naltrexona (Ntx), antagonista opioide en el tratamiento del alcoholismo	15
Regulación de receptores	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
OBJETIVO GENERAL, OBJETIVOS PARTICULARES	20
HIPÓTESIS	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	
Material y método	22
Tratamiento	
Experimento 1	22
Experimento 2	22
Experimento 3	23
Variables	24
Dependientes	
Independientes	
RESULTADOS	
Experimento 1, administración periódica de Ntx(2mg/kg) sin exposición al alcohol y acceso voluntario al mismo en el periodo posterior al tratamiento (Ntx1).	25

Experimento 2, administración periódica de Ntx(2mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx2)	30
Experimento 3, administración periódica de Ntx(10mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx3)	35
DISCUSIÓN	
Experimento 1, administración periódica de Ntx(2mg/kg) sin exposición al alcohol y acceso voluntario al mismo en el periodo posterior al tratamiento (Ntx1).	41
Experimento 2, administración periódica de Ntx(2mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx2)	43
Experimento 3, administración periódica de Ntx(10mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx3)	45
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	51

RESUMEN

El alcoholismo se considera una enfermedad crónica, progresiva y a menudo mortal. Entre los grandes retos del tratamiento del alcoholismo se encuentra el evitar o reducir el consumo de alcohol y las recaídas, para lo cual se han empleado diferentes sustancias entre ellas los antagonistas opioides como la naltrexona. El uso de esta sustancia se basa en las propiedades que tiene de bloquear a los receptores opioides decrementando las propiedades reforzantes del alcohol. Aunque las evidencias han mostrado que la Ntx es eficaz, también muestra que la eficacia es altamente dependiente del método utilizando en la administración del medicamento. Con base en estos datos consideramos importante estudiar el posible efecto diferencial de la asociación o disociación de estímulos farmacológicos como son los antagonistas y el alcohol sobre la cantidad de alcohol consumida durante y al término del tratamiento de manera intermitente.

Método: Se utilizaron 6 grupos de ratas Wistar machos los cuales se dividieron en 3 experimentos. Exp 1) Ntx 1.- 2mg/kg de Ntx/día/7 días sin acceso al alcohol (T) seguido de 5 días de acceso diario y voluntario al alcohol (PT). Grupo control (Ctrl 1) mismo procedimiento que Exp 1 sustituyendo Ntx por vehículo. Exp 2) Ntx 2.- 2mg/kg de Ntx/día/7 días con acceso simultáneo y voluntario a alcohol (T) seguido de 7 días de acceso voluntario al alcohol (PT). Grupo control (Ctrl 2) mismo procedimiento que Exp 2 sustituyendo Ntx por vehículo. Exp 3) Ntx 3.- mismo procedimiento que el Exp 2 pero con una dosis de 10mg/kg de Ntx/día/7 días y su respectivo control (Ctrl 3). El procedimiento descrito para cada grupo se repitió en 4 ocasiones sucesivas.

Resultados: Comparando Ntx 1 y Ctrl 1, se observó un consumo de alcohol significativamente mayor para Ntx 1 en las cuatro semanas posteriores a la administración de la Ntx. En Exp 2 se observó un incremento en el consumo de alcohol voluntario en la semana 1 (T1), para ambos grupos, que coincidió con el periodo de inicio de manipulaciones. Este consumo presentó una tendencia a decrementarse en los siguientes periodos de T y PT pero no hubo diferencias atribuibles a la Ntx, con respecto al alimento se observó un decremento en el consumo en 3 de los 4 periodos de tratamiento, probablemente debido al efecto de la Ntx. En Exp 3 no se observó decremento del consumo de alcohol durante este tratamiento, incluso el consumo de alcohol, presentó una tendencia a incrementarse durante la fase de tratamiento independiente de la administración de la Ntx o Veh. La administración de 10mg/kg incrementó significativamente la ingesta alimenticia con respecto al grupo ctrl. Conclusiones: Considerando estos experimentos, Exp 1 apoyaría la posible sobrerregulación de receptores causada por el antagonista opioide produciendo un incremento en el consumo del alcohol, en Exp 2 no se observó el efecto de la Ntx descrito en la literatura, donde se encuentra un decremento en el consumo aún con dosis más bajas. Posiblemente en este caso no encontramos dicho decremento debido a que la metodología es diferente a la de otros autores. El Exp 3 muestra que pudiera estar asociado a la afectación de diferentes componentes motivacionales relacionados con el sistema opioide. La afectación de la conducta alimenticia en el Exp 3 apoya que la Ntx puede tener efectos sobre otros estímulos con propiedades reforzantes distintos a los descritos para el alcohol. La ausencia de efectos sobre el consumo de alcohol pudiese deberse a la estrategia metodológica usada en el presente estudio que no obstante representa un modelo más apegado a la estrategia utilizada en clínica.

ABSTRACT

Alcoholism is considered a chronic, progressive and mortal disease. One of the big challenges for the treatment of alcoholism is to reduce or avoid the alcohol consumption and relapse. For this purpose, it has been used different substances such as Naltrexone an opioid antagonist. The use of this substance is based on the properties to blockade the opioid receptors reducing the reinforcing properties of alcohol. Although the evidence had demonstrated the effectiveness of Ntx, also shows that the efficacy is dependent from the used method in the administration of this substance. This research studied the possible differential effect of the association or dissociation of pharmacological stimulus such as alcohol and opioid antagonists on the quantity of alcohol consumption during and at the end of treatment in an intermittent procedure.

Method: 6 groups of male Wistar rats assigned to 3 experiments. Exp 1) Ntx 1.- 2mg/kg Ntx/day/7 days without access to alcohol (T) followed by 5 days of daily access to free-choice to alcohol and water (PT). Control group (Ctrl 1) same procedure than Ntx 1 replacing Ntx for vehicle. Exp 2) Ntx 2.- 2mg/kg Ntx/day/7 days with simultaneous to free-choice access (T) followed by 7 days to free-choice access (PT). Control Group (Ctrl 2) same procedure than Ntx 2 replacing Ntx for vehicle. Exp 3) Ntx 3.- same procedure than Ntx 2 but with a different doses 10mg/kg Ntx/day/7 days and its respective control (Ctrl 3). The method described for each group was repeated 4 time consecutively.

Results: Comparing Ntx 1 and Ctrl 1, the alcohol consumption was significantly greater in the Ntx 1 group in the 4 periods following to the administration of Ntx. In Exp 2 we observe an increment in alcohol voluntary consumption in week 1 (T1), for both groups (Ntx 2 and Ctrl 2), which coincide with the period in the beginning of the pharmacological manipulation. In the T and PT periods alcohol intake showed a tendency to decreasing but there were not differences ascribed to Ntx. In food intake we observed a decrease in consumption on 3 of the 4 periods of treatment, probably due to the effect of Ntx. Analyses of Exp 3 showed no decrease in alcohol consumption during the Ntx treatment, inclusive this consume, showed a tendency to increase during the treatment phase regardless of the Ntx o Veh administration. The administration of 10mg/kg of Ntx produced a higher food consumption in this group than in Ctrl group.

Conclusions: Results show that, Exp 1 suggest a possible receptor upregulation caused by the opioid antagonist, producing a higher alcohol consumption. In Exp 2 there was not effect of Ntx such as the described on literature, were we found a drecreasing consumption even with lower doses. In this case we don't found any decrement, it could be due to the used method, different to other authors. Exp 3 shows that it could be associated to the affection of different motivational components related with the opioid system. The affectation on the food intake in Exp 3 support s that Ntx could have differents effects on stimulus with different reinforcing properties other than those described for alcohol. The absence of alcohol consumption effects it could be due to the methodological strategy used on the present research, that nevertheless, represents a model more attached to the clinical strategy.

INTRODUCCIÓN

Definición de alcoholismo

El alcohol, la nicotina y la cocaína son en la actualidad de las drogas más usadas, ocupando el primer lugar el alcohol por su fácil acceso. La dependencia al alcohol produce grandes dificultades, laborales, sociales, familiares, físicas, etc. por lo que causa problemas económicos tanto a las familias como al gobierno.

El alcoholismo es un tipo de farmacodependencia, en la cual existe tanto adicción física como psicológica. En la dependencia física se manifiestan síntomas como mareo, náuseas, dolor de cabeza, cuando el consumo de alcohol se interrumpe. El alcohol afecta al sistema nervioso central y actúa como un depresor que desencadena ansiedad, tensión y una disminución de la actividad. Aún con niveles bajos de alcohol dentro del organismo se produce lentitud en las reacciones, en la concentración, el juicio del individuo se deteriora y en cantidades excesivas produce intoxicación y envenenamiento.

Una de las características del individuo alcohólico es que se vuelve antisocial, incrementando los problemas en las áreas, familiar, laboral, escolar y penal. Aproximadamente el 15% de los hombres y el 5% de las mujeres alcohólicas tienen personalidad antisocial.

No existe una causa definida para el alcoholismo. Sin embargo, varios factores pueden jugar un papel importante en su desarrollo. En las familias con un padre o una madre alcohólica, es probable que alguno de sus descendientes se convierta en un individuo alcohólico comparado con un individuo sin padres alcohólicos. La razón de esta situación es desconocida, pero se pueden presentar anomalías genéticas o bioquímicas. Entre los factores psicológicos está la necesidad de disminuir la ansiedad, conflictos de relaciones interpersonales sin resolver o baja autoestima. Entre los factores sociales están la disponibilidad del alcohol, la aceptación social del consumo de alcohol, la presión del compañero y estilos de vida estresantes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el alcoholismo como la ingestión diaria de alcohol superior a 50 gramos en la mujer y 70 gramos en el hombre.

Intoxicación aguda y crónica

Podemos considerar que existen dos tipos de intoxicación debida al consumo de alcohol, cada una con características diferentes: intoxicación aguda e intoxicación crónica.

La intoxicación aguda se refiere a los primeros contactos con la droga, a través de los cuales se establece el conocimiento de sus efectos placenteros y/o displacenteros y se establece el aprendizaje que promueve su consumo.

Durante la intoxicación crónica tienen lugar fenómenos de neuroadaptación, que podrían representar una reacción del organismo con tendencia a retornar a la homeostasis o el equilibrio orgánico, fundamental para la vida. Sin embargo hay cambios críticos a nivel intracelular y se desarrolla una sensibilización en la liberación de DA mesolímbica, hechos que resultan de gran importancia en el establecimiento de la dependencia y del síndrome de abstinencia tras el cese del consumo (Fernández-Espejo, 2002).

Una vez que el sujeto ha superado la fase aguda de abstinencia, comienza la fase asintomática de abstinencia a largo plazo. Durante dicha fase, el sujeto puede superar definitivamente su drogadicción con apoyo médico y psicoterapéutico adecuado, pero tienen lugar fenómenos importantes que suelen originar la recaída de un número importante de sujetos en el consumo de la droga: el “ansia de droga” y la “abstinencia condicionada”. Durante el ansia de droga el sujeto presenta deseos imperiosos de volver a consumir la droga, y durante la abstinencia condicionada aparece sintomatología de abstinencia, a veces sin razón aparente. No se conocen las bases neurobiológicas de este fenómeno, pero se sabe que se relaciona con el proceso de sensibilización de la fase de consumo crónico de la droga, originando cambios permanentes en los circuitos límbicos (Fernández-Espejo, 2002).

Durante mucho tiempo los psicólogos han reconocido la importancia del reforzamiento positivo y negativo en el aprendizaje y en conductas particulares (Koob y LeMoal, 1997). Ratas y otros animales de laboratorio se les enseña a autoestimular circuitos placenteros en el cerebro hasta terminar exhaustos. Si se administra cocaína, anfetaminas, heroína o nicotina se incrementa tanto la sensibilidad a respuestas placenteras, al grado que el sujeto deja de comer y prefiere seguir autoestimulando los centros placenteros. Este proceso en el que existe una acción que induce placer y que se vuelve repetitiva se denomina reforzamiento positivo. Recíprocamente, la discontinuación de alcohol, opioides u otras drogas psicoactivas después del uso crónico

producen incomodidad y búsqueda. La motivación por utilizar una sustancia para evitar esta incomodidad se le denomina reforzamiento negativo. (O'Malley, 1998)

Metabolismo del alcohol

El paso del etanol a través de las membranas biológicas ocurre por un proceso de simple difusión pasiva por el gradiente de concentración. Debido al bajo peso molecular y su alta afinidad con el agua, el etanol se mueve por los mismos canales transmembranales por los que pasa el agua. Se distribuye desde la sangre a todos los tejidos y fluidos en proporción a su contenido relativo de agua. Se elimina por la orina, respiración y sudor; menos del 10% del alcohol consumido se excreta, mientras que el 90-95% es normalmente metabolizado (Wiberg, Samson, Maxwell, Coldwell, y Trenholm, 1971)

Aproximadamente un 20% del alcohol ingerido se absorbe a nivel del estómago y el resto en el intestino, existiendo un retardo en la absorción gástrica en presencia de alimentos, por lo que los efectos del consumo de alcohol serán más pronunciados si se consume con el estómago vacío. Es muy hidrosoluble y difunde rápidamente. El metabolismo del alcohol es fundamentalmente hepático aunque en riñón se puede metabolizar hasta un 20%. Por acción de la alcohol dehidrogenasa se transforma en acetaldehído y éste por la acetaldehído dehidrogenasa pasa a ácido acético (Fig 1). Por acción de las oxidasas hepáticas también se produce el paso de alcohol a acetaldehído.

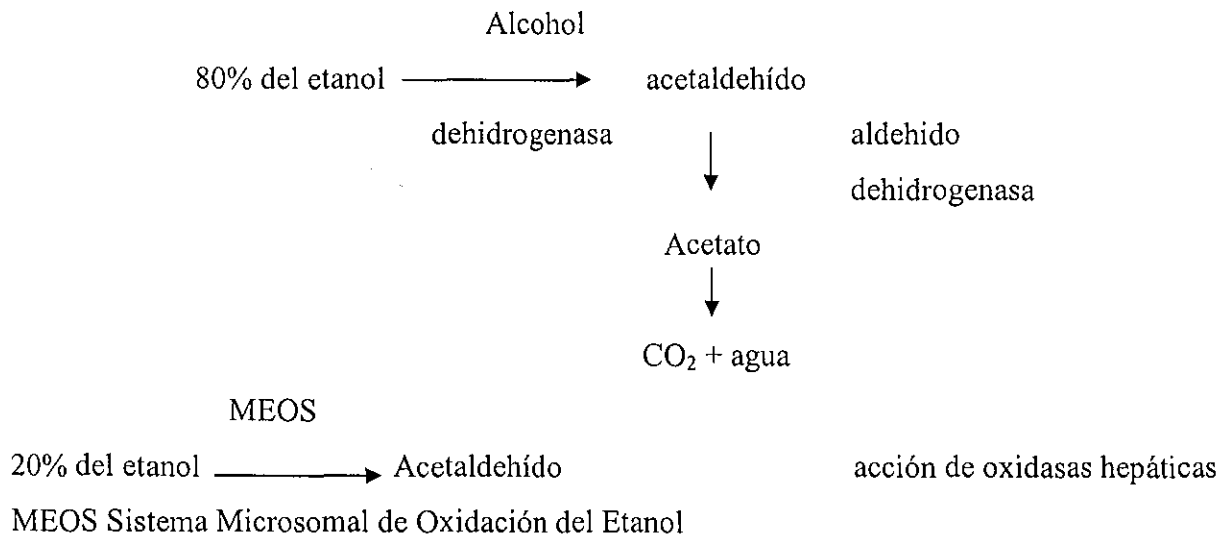


Fig. 1 Proceso catabólico del alcohol. Enzimas que participan en dicho proceso.

Cuando se consume alcohol este es primero convertido a acetaldehído y finalmente a dióxido de carbono y agua (Fig 1). Esta conversión final es transformada por la acetaldehído dehidrogenasa. Sin embargo, el acetaldehído es mucho más atrayente para la enzima que el aldehído de dopamina. Como resultado una gran cantidad de acetaldehído reacciona con la enzima y lo destruye. Esta acción deja un exceso de aldehído de dopamina en el cerebro. El exceso de moléculas de acetaldehído pueden combinarse o mezclarse con ciertos metabolitos de la dopamina produciendo un alcaloide, la tetrahidroisoquinolona (Blum y Payne, 1991; Oswald y Wand, 2004). Otros estudios demostraron que este alcaloide se puede unir a receptores opioides y producir efectos semejantes a los opioides (Oswald y Wand, 2004). El consumo de alcohol puede ser importante en la producción de compuestos adictivos del tipo de los opiáceos; y el abuso del alcohol es una adicción que encierra procesos bioquímicos similares a aquellos asociados con la dependencia de los opioides (Blum y Payne, 1991).

Farmacología del alcohol

La farmacología de la dependencia física al alcohol es extremadamente compleja, particularmente en relación al impacto sobre la conducta de beber. La dependencia física es una manifestación de reacciones adaptativas intracelulares al efecto depresivo del alcohol en el proceso metabólico, fisiológico y bioquímico del cerebro. Adaptaciones compensatorias en cada una de estas áreas cerebrales permiten a las células del cerebro funcionar más o menos normalmente, aún en presencia de niveles potencialmente tóxicos de alcohol. Estas adaptaciones son también el mecanismo básico que subraya el desarrollo de la tolerancia fisiológica. Representan una hiperactividad compensatoria de la función de las células del cerebro para contrarrestar el efecto inhibitorio del alcohol. Cuando se suspende la bebida, a menudo por los efectos tóxicos del alcohol, las neuronas hiperactivas del cerebro, que no están más deprimidas por el alcohol, muestran una excesiva excitabilidad en todo el cerebro, produciendo el síndrome de abstinencia al alcohol. (Kalant, 1996)

Varios estudios muestran que los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y de péptidos opioides en el cerebro juegan un papel clave en el reforzamiento del alcohol (Terenius, 1996; Tomkins y Sellers, 2001; Gianoulakis, 2001; Schuckit, 2000).

El alcohol interactúa con muchos sistemas de neurotransmisión, entre ellos, el sistema de péptidos opioides endógenos el cual influye en el sistema mesolímbico dopaminérgico (Terenius 1996, Tomkins y Sellers, 2001). La activación de esta vía y de los opioides inducida por alcohol puede jugar un rol crítico mediado por las propiedades reforzantes de éste. La regulación a la baja de estos sistemas durante la exposición repetida al alcohol o durante la abstinencia puede producir sensaciones de disforia o deseo que incrementa la probabilidad de recaídas (Wand, 1996). La administración crónica del alcohol puede resultar en un incremento en el número de receptores en el cerebro que son sensibles a la dopamina y es probable que los cambios en este sistema neuroquímico sean importantes en los efectos observados con la administración de alcohol. La dopamina liberada en el núcleo accumbens puede mediar parcialmente el efecto de recompensa de los opioides, alcohol y de otra variedad de drogas de abuso (Charness, 1996).

El alcohol también produce un incremento en la liberación de serotonina en el cerebro. Se ha visto que el consumo agudo de alcohol, incrementa la liberación de serotonina, pero la administración crónica tiende a decrementar la cantidad de serotonina almacenada en el sistema nervioso central (Schuckit, 2000), lo cual, se ha postulado, lleva a la depresión en el alcohólico.

El alcohol y los péptidos opioides comparten muchas características farmacológicas y exhiben efectos similares sobre el comportamiento en animales y en el hombre.

Definición de sustancias opioides

Se denomina *opioides* (término derivado de *opio* cuyo principal componente activo es la morfina) a un conjunto de sustancias que deprimen la actividad del sistema nervioso central. El sistema opioide está involucrado en 3 funciones principales:

- modulación de la respuesta a estímulos dolorosos y estresantes,
- en el reforzamiento,
- en funciones homeostáticas de adaptación, como la regulación de la temperatura corporal, consumo de agua y alimento (Gianolakis, 2001).

Existen tres familias de opioides endógenos. Las encefalinas que se unen preferentemente a receptores delta surgen de un precursor llamado proencefalina. El segundo grupo son las beta-endorfinas, las cuales se unen preferentemente a receptores mu y delta, éstas provienen del precursor propiomelanocortina. La tercera familia son las dinorfinas, las cuales se unen a receptores kappa y provienen del precursor prodinorfina. (Schuckit, 2000; Oswald y Wand, 2004).

Cada uno de estos precursores tiene una distribución anatómica a lo largo de todo el CNS y en los órganos periféricos (Akil, Watson, Young, Lewis, Khachaturian, & Waiker, 1984). En el cerebro adulto las beta-endorfinas y otros productos de la proopiomelanocortina se localizan en dos grupos de células: en el núcleo arcuato del hipotálamo y en el núcleo del tracto solitario del tallo cerebral. Varias proyecciones de las neuronas del núcleo arcuato recorren largas distancias para inervar regiones del cerebro anterior, incluyendo el área preóptica medial, el núcleo accumbens (Acc), el septum, el tálamo paraventricular, el cerebro medio y el posterior, incluyendo la materia gris periacueductal y el tallo cerebral reticular (Leslie y Loughlin, 2000; Gianoulakis, 2001). Las principales regiones asociadas con el sistema de reforzamiento son el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (N Acc), el área septal, la amígdala, el hipotálamo y la corteza frontal. (Gianoulakis, 2001)

Los opioides endógenos, beta-endorfinas y encefalinas tienen también propiedades de reforzamiento e incrementan la liberación de DA en el Acc (Oswald y Wand, 2004).

Los receptores mu y kappa juegan un importante papel en la integración sensorial, tanto en la regulación de la secreción de hormonas del eje hipotalamo-pituitaria y de las conductas homeostáticas como consumo de alimento y agua, conducta sexual y regulación de la temperatura.

La activación de los receptores mu y delta suelen producir patrones semejantes en la liberación de neurotransmisores, mientras que la activación de receptores kappa suelen producir patrones opuestos (Oswald y Wand, 2004)

In vivo, la administración de etanol incrementa la liberación de beta-endorfinas por la glándula pituitaria, el hipotálamo y otras regiones. (Rasmussen, Bryant, Boldt, Colasurdo, Levin, & Wilkinson, 1998; Gianoulakis y Barcomb, 1987; Thiagarajan, Mefford, & Eskay, 1989). También se sabe que bajas concentraciones de alcohol inducen un incremento más pronunciado en la liberación de beta-endorfinas que altas concentraciones (Gianoulakis, 1990; de Waele, Papachristou, & Gianoulakis, 1992). Además, estudios con técnicas autoradiográficas indican que los cambios en los receptores inducidos por el etanol parecen variar dependiendo de las regiones del cerebro y el linaje de los animales usados (Gianoulakis, 2001). Así el consumo de alcohol voluntario por 30 días en ratas Sardinian con preferencia al alcohol producen incremento en las uniones a ambos receptores opioides mu y delta en el caudado, pero no tiene efecto en otras regiones estudiadas. Sin embargo, el consumo de alcohol en ratas Wistar induce sub-regulación

de los receptores μ en el Acc y estriado pero no tiene efecto en los receptores $\delta 1$ y $\delta 2$ (Turchand, Przewlocka, Toth, Lason, Borsodi, & Przewlocki, 1999).

Relación entre el alcoholismo y los Sistemas neuroquímicos

Aunque las drogas adictivas presentan una gran diversidad molecular y actúan sobre diversos receptores y estructuras, existe un factor común a las mismas, que es la activación de la vía mesolímbica dopaminérgica, crítica en el proceso de dependencia y adicción. Esta vía nace en el área tegmental ventral (ATV), y su activación durante el consumo agudo induce el incremento en la tasa de liberación de DA y una regulación a la alza en los niveles de AMPc en el Acc y la amígdala, áreas que se relacionan decisivamente con la recompensa y con el aprendizaje para su consumo (Fernández-Espejo, 2002; Herz, 1997).

Las neuronas hipotalámicas sintetizan y liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual es transportada a la pituitaria, interactúa con pro-opiomelanocortina (POMC) produciendo células y estimulando la síntesis y liberación de adrenocorticotropina (ACTH), beta-lipotropina (β -LPH) y beta-endorfinas. CRH también interactúa con neuronas endorfinérgicas hipotalámicas y estimulan la síntesis y liberación de beta-endorfinas en el cerebro. El etanol incrementa la liberación de CRH lleva al incremento de la liberación de beta-endorfinas, ambas por la pituitaria y el hipotálamo. (Gianoulakis, 2001).

La dopamina produce sensaciones inmediatas de placer y de júbilo que refuerzan actividades naturales como el sexo y la ingesta tanto en humanos como en animales y motiva la repetición de estas conductas. Se cree que juega un papel importante en el reforzamiento y motivación de acciones repetidas (O'Malley S, 1998). El alcohol parece incrementar la liberación de dopamina de manera dosis-dependiente, esto es, más dopamina es liberada cuando se consume más cantidad de alcohol (Nash, 1997; Ulm, Volpicelli, & Volpicelli, 1995).

Existe evidencia que el aumento de dopamina después de la administración de alcohol es mediada, en parte, por el sistema opioide (Strother et al, 2001) a su vez existen datos que indican que el consumo de alcohol puede ser dependiente de la activación de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas pero el mantenimiento de esta conducta no requiere de la integridad funcional de estas neuronas (Spanagel & Weiss, 1999; Ikemoto, McBride, Murphy, Lumeng & Li, 1997).

De acuerdo a un modelo creado por Jamensky y Gianoulakis (1997) el alcohol estimula la producción de beta-endorfinas en el núcleo arqueado del hipotálamo por neuronas que se extienden a otras regiones cerebrales incluyendo el ATV y el Acc. Las beta-endorfinas pueden directa o indirectamente estimular la liberación de dopamina en el Acc. Por ejemplo la presencia de beta-endorfinas en ATV bloquea la actividad de las neuronas GABAérgicas en esta área.

El Acc, el cual es una estructura localizada en la base del estriado, es la zona clave que media los efectos de reforzamiento de las drogas como las anfetaminas y cocaína, las cuales actúan directamente en las terminales dopaminérgicas para incrementar la liberación de DA (Wise, 1984).

Como resultado, dichas neuronas no continúan inhibiendo las neuronas dopaminérgicas en ATV y la dopamina se libera en Acc. El etanol eleva las concentraciones extracelulares de dopamina en el Acc, aunque evidencia reciente enlaza este efecto con acciones directas en los somas del ATV dopaminérgica mucho más que en las terminales dopaminérgicas del Acc (Weiss & Porrino, 2002).

El etanol parece facilitar la liberación de dopamina incrementando la actividad opioidérgica, desinhibiendo las neuronas dopaminérgicas por la vía de los receptores mu-opioides en el ATV y los receptores delta-opioides en el Acc. Los efectos del etanol pueden ser antagonizados por los receptores presinápticos kappa-opioides presente en las terminales dopaminérgicas del Acc. (Tomkins & Sellers, 2001; Cowen & Lawrence, 1999). En el síndrome de abstinencia al alcohol y a la morfina existe una severa inhibición en la liberación de la dopamina en el Acc.

Cuando hay abstinencia al alcohol después de una intoxicación crónica, se incrementa la sensibilidad de la dopamina a los receptores en el Acc. Cuando la dopamina ha disminuido, los receptores están muy sensitivos por lo que el efecto reforzante se incrementa y esto aumenta el anhelo de beber (Blum & Payne, 1991).

En consecuencia, es posible que la preferencia por el alcohol esté asociada con una activación aumentada del sistema opioide y del sistema dopaminérgico.

Por lo tanto las regiones con diferencias significativas en receptores delta y mu opioide están implicados en la recompensa y motivación, ofreciendo buena evidencia para el papel de receptores opioide endógeno en este sistema, el cual tiene un impacto en las conductas de búsqueda y consumo de alcohol.

Como se mencionó anteriormente existe evidencia de que hay un vínculo bioquímico entre el alcoholismo y los opiáceos induciendo la respectiva dependencia. Este vínculo está basado en las observaciones de que el producto del metabolismo del alcohol, puede interactuar en un receptor opioide (Hamilton & Hirst, 1980).

El alcohol modifica la síntesis y liberación de algunos péptidos opioides así como de la actividad de receptores mu y delta (Mendez & Cruz, 1999).

Se ha descrito que existe relación entre el sistema opioide y la disposición genética en conductas de búsqueda de alcohol tanto en humanos como en roedores. Las ratas alcohólicas tienen menor cantidad de uniones de encefalinas en regiones corticales y en ciertas estructuras límbicas comparadas con las ratas no alcohólicas, baja densidad de uniones de encefalinas en la región cortical puede indicar poca cantidad de receptores delta-opioides, o disminuida afinidad de uniones agonistas al sitio del receptor o ambas (Strother, Chernet, Lumeng, Li & McBride, 2001). Las ratas alcohólicas tienen mayor cantidad de receptores mu opioides en ciertas regiones límbicas (Acc, ATV) las cuales están implicadas en la regulación del consumo del alcohol (de Waele et al, 1995). Las diferencias innatas de receptores delta y mu-opioides en áreas límbicas y de asociación en ratas alcohólicas puede resultar en la alterada sensibilidad a los mecanismos de recompensa y puede explicar el alto consumo de alcohol en estas ratas.

De acuerdo a la hipótesis “deficiencia de opioides” la característica hereditaria de los bajos niveles de opioides basales puede hacer que los sujetos consuman alcohol para compensar esta deficiencia, incrementando la actividad opioide en el cerebro y esto puede ser resultado directo de un consumo crónico de alcohol. (Kiefer, Horntrich, Jahn & Widemann, 2002; Oswald & Wand, 2004).

Genazzani, Nappi, Facchinetti, Mazzella, Parrini, y Sinforiani (1982) encontraron que los niveles normales de opioides en la sangre de alcohólicos es un factor que discrimina la adicción al alcohol o a la heroína debido a que los niveles de beta-endorfinas están suprimidos. Esto conlleva a que haya un aumento de receptores para poder captar la poca cantidad de opioide existente en el cerebro, todo esto juega un papel importante en la conducta de búsqueda de sustancias como el alcohol. A su vez, Gianoulakis, Krishnan y Thavundayil, (1996) encontraron que el sistema pituitaria-beta-endorfinas de los sujetos con alto riesgo a beber, es más sensible al etanol que los de bajo riesgo. Encontraron un efecto significativo de riesgo en los niveles basales de beta-endorfinas en sangre y cortisol para los sujetos de bajo riesgo, siendo este mayor que los

de alto riesgo. La ingestión moderada de alcohol induce un incremento de tipo dosis-dependiente en los niveles de beta-endorfinas en sangre de sujetos de alto riesgo y de bajo riesgo, sugiriendo un incremento en el sistema pituitaria-beta-endorfinas al etanol, un factor que puede ser importante mediando los efectos reforzantes del alcohol.

Por otro lado se sabe que el sistema opioide está involucrado en funciones de regulación, como son el tiempo circadiano, la conducta sexual y la ingesta de líquidos y alimento (Jones, Corp, & Wade, 2001; Lowy & Yim, 1982; Jalowiec, Panksepp, Zolovick, Najam & Herman, 1981; Yeomans & Gray, 2002).

La Naltrexona (Ntx), antagonista opioide en el tratamiento del alcoholismo

El desarrollo de agentes farmacológicos capaces de modificar la transmisión de los péptidos opioides, así como la de otros neurotransmisores en el cerebro, tiene un uso terapéutico potencial para el tratamiento del alcoholismo en humanos.

Un aspecto clínicamente relevante en la farmacología de opioides y en la actividad de receptores es el incremento en el conocimiento sobre antagonista opioides. Estas drogas pueden competir con los opioides por el receptor y así bloquear su efecto en el reforzamiento.

La naltrexona un antagonista opioide inespecífico, tiene una vida media de 2.7 ± 1.0 hrs (González & Brogden, 1988). El tratamiento con naltrexona es de los más eficaces para el control del alcoholismo así como también de los más estudiados, el cual al bloquear la unión del ligando opioide con su receptor se deduce que decrementa las propiedades reforzantes del alcohol en bebedores sociales y disminuyen la ingesta excesiva de la sustancia (Mendez & Cruz, 1999; Volpicelli, Clay, Watson, & O'Brien, 1995; Gardell, Hubbell, & Reid, 1996; Parkes & Sinclair 2000; Reid, Gardell, Chattopadhyay, & Hubell, 1996; Stromberg, Volpicelli, & O'Brien, 1998). Se ha descrito que la atenuación de las propiedades reforzantes del etanol por antagonistas opioides puede estar relacionada con la inhibición de la acción de endorfinas endógenas en el núcleo accumbens (Weiss & Porrino, 2002) y con el bloqueo de la acción opioide sobre las neuronas que modulan la actividad dopaminérgica en el área tegmental ventral (Weiss, Lorang, Bloom, & Koob, 1993; Philpot & Kirstein, 1998; Tomkins & Sellers, 2001).

La FDA (Food and Drug Administration) en 1994 y asociaciones similares en varios países han aprobado la Ntx para su uso en programas de tratamiento del alcoholismo.

La Ntx y naloxona aunque son antagonistas no selectivos son capaces de unirse a receptores μ . La estimulación de receptores opioides, especialmente aquellos de la variedad de los μ , tienen un impacto en el neurotransmisor dopamina, en el sistema GABA y en la serotonina (Schuckit, 2000). La afinidad de la naloxona y naltrexona a los receptores delta y kappa es menor que a los receptores μ (Kosterlitz & Paterson, 1980; Shaw, Miller, Turnbull, Gormley, & Morley, 1982). La administración de antagonistas selectivos de los receptores μ y delta reducen la preferencia por alcohol y la ingesta de la sustancia en animales (Boyadjieva, Chaturvedi, Poplawski, & Sarkar, 2004; Hallmark & Hunt, 2004; Ciccocioppo, Martin-Fardon, & Weiss, 2002). El etanol incrementa las endorfinas extracelulares en Acc, sugiriendo que la atenuación de las propiedades reforzantes del etanol por antagonistas opioides puede estar relacionada con la inhibición de la acción de endorfinas endógenas en dicha área (Weiss & Porrino, 2002).

La naltrexona previene el aumento de los niveles de dopamina en el Acc durante la administración voluntaria de alcohol (González & Weiss, 1998, Weiss & Porrino, 2002). Se ha demostrado que la naltrexona decreta la tasa de disparo neuronal dopaminérgica y la síntesis de dopamina en el Acc inducido por el consumo voluntario de alcohol (Inoue, 2000). El bloqueo de receptores opioides reduce o elimina la estimulación inducida por el etanol en la liberación de DA en el Acc lo que sugiere que la DA puede participar en el mecanismo por el cual los opioides median las acciones del etanol. El antagonista opioide puede producir daño en el reforzamiento del etanol, previniendo la estimulación inducida por el etanol en la liberación de DA (Di Chiara, 1996). En investigaciones con roedores, el efecto agonistas o antagonista en la liberación de DA, en parte, depende de cuál tipo de receptor es involucrado y si la droga es aplicada en el área tegmental ventral o directamente en el Acc (Oswald & Wand, 2004).

Hill y Kiefer (1997), encontraron que la naltrexona produce un cambio dependiente de la dosis en la palatabilidad del alcohol al 10%, la dosis alta de naltrexona causa un mayor decremento en la respuesta de ingestión así como también un aumento en la respuesta aversiva. La naltrexona suprime el consumo del alcohol dependiendo de la dosis. En sus experimentos obtuvieron que los grupos inyectados con 1.0 y 3.0 mg/kg de peso de naltrexona, se disminuía el consumo, con un mejor efecto en la dosis mayor.

Por otro lado la naltrexona puede reducir el consumo de agua mientras este antagonista es administrado. Goodwin, Campisi, Babinska, y Amit, (2001) encontraron que cuando se les

administraba 10mg/kg de Ntx (i.p) diariamente 1hr antes de que se les apagara la luz a ratas machos Long-Evans y Wistar, midieron el consumo de 24hrs de alcohol al 10%, sacarina al 0.1%, quinina al 0.0006%, sacarina 0.4% + alcohol al 10%, y sacarina 0.4% + quinina 0.04% y observaron que el consumo de agua disminuía con respecto a la LB durante la fase de tratamiento en todos los grupos excepto en aquel que bebió cuando se tenía acceso al agua junto con la solución de sacarina al 0.1%. La reducción en el consumo de agua fue probablemente el resultado en el incremento del consumo de las sustancias saborizadas a las cuales los sujetos tenían acceso voluntario y no hubo recuperación aún cuando la Ntx se suspendió. Estos datos no se confirman en otros estudios realizados por diferentes autores, los efectos de la Ntx dependen de las condiciones experimentales es decir, de la dosis y del consumo de otras sustancias. Por otro lado se sabe que la Ntx reduce selectivamente el consumo de fluidos que mantiene la mayor cantidad de respuestas (Williams & Woods, 1999).

Regulación de receptores

Una reducción inducida por un antagonista en el número de receptores en un periodo relativamente largo de tiempo se denomina como *regulación a la baja*. Cuando la síntesis de receptores se incrementa suele denominarse *regulación a la alta o sobre-regulación* el cual puede mediar el incremento de la función.

Regulación a la alta

Cuando los receptores no son activados por un periodo prolongado, tanto por la ausencia del agonista o por el bloqueo de receptores por un antagonista, el número de receptores se incrementa produciéndose así la sobre-regulación de receptores. Esta sobre-regulación de receptores opioide, incrementa el potencial para la actividad opioidérgica, produciéndose un incremento en la frecuencia y en la magnitud del consumo de alcohol (Parkes & Sinclair, 2000).

La administración crónica de naloxona y naltrexona induce a la sobre-regulación de sitios de unión de opioides en el cerebro de la rata y el ratón. Numerosos estudios muestran que la sobre-regulación inducida por antagonistas es debida al aumento del número de receptores y no por un cambio de afinidad del mismo, esto parece ser la base de la supersensibilidad a agonistas opioides en diversos bioensayos tanto en vivo como in vitro (Brady, 2000).

Las regiones en las que los receptores μ son sobre-regulados por la administración crónica de naltrexona parecen estar asociados por lo menos con tres sistemas funcionales (Tempel, Gardner & Zukin, 1984):

- El sistema límbico: Acc, amígdala, septum lateral e hipotálamo, áreas que contienen dopamina como neurotransmisor.
- El segundo sistema es la sustancia gris periacueductal, el cual está involucrado en la analgesia y la nocicepción. La sobre-regulación de receptores μ en la sustancia gris periacueductal (Tempel, et al 1984; Yoburn, Nunes, Alder, Pasternak, & Inturrisi, 1986) y la medula espinal (Yoburn, Sierra, & Lufty, 1989; Guzmán, Legendre, Allard, Geoffre, Vincent & Simonnet, 1989) son responsables del incremento de la potencia analgésica de la morfina en animales tratados con naltrexona o naloxona.
- El tercer sistema involucra diversas regiones cerebrales las cuales reciben entradas de vías sensoriales aferentes, como en las capas superficiales del colículo superior, la capa molecular del hipocampo, las capas I y III de la neocorteza y el núcleo parabraquial. Se ha sugerido que la administración crónica de naloxona o naltrexona activa la vía encefalinérgica, así como la vía sensorial viscerceptiva, nociceptiva y visceral, resultando una sobre-regulación compensatoria de receptores opioides μ en estas regiones cerebrales (Tempel et al 1984).

La sobre-regulación de receptores μ , delta y kappa parece depender de la dosis del antagonista administrado crónicamente y del grado de ocupación de los tres tipos de receptores.

La sobre-regulación de receptores μ es acompañada por la supersensibilidad del receptor. El grado de sensibilidad parece estar en función a la concentración inicial de receptores opioides en el cerebro (Brady, 2000).

Regulación a la baja

Este tipo de regulación de receptores también es denominada *desensibilización* (Foreman & Johansen, 2002). Este término se refiere a un decremento progresivo en la respuesta a un neurotransmisor durante la exposición o múltiples exposiciones de la célula al mismo trasmisor. En algunos casos la desensibilización resulta de la internalización de receptores (Levitan & Kaczmarek, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una relación estrecha entre el sistema opioide y el consumo de alcohol. Se ha descrito que la administración crónica de alcohol incrementa la liberación de péptidos opioides en el hipotálamo de roedores (Gianoulakis, 1990) y en la pituitaria en el humano (Gianoulakis, Krishnan, & Thavundayil, 1996). Estudios clínicos recientes han mostrado que los antagonistas de péptidos opioides pueden disminuir el consumo del alcohol y las recaídas en pacientes alcohólicos. De esta manera, la naltrexona, un antagonista opioide, produce un decremento en el consumo del alcohol (Reid, et al 1996; Froehlich, 1996; Parkes & Sinclair, 2000; Sinclair 2001, Stromberg, et al, 1998; Gardell et al, 1996). Por otro lado, Parkes y Sinclair (2000), plantean que la sobre-regulación de receptores opioides, producida por la exposición a un antagonista como la Ntx, incrementa el potencial de la actividad opioide una vez que la unión ligando receptor ha cesado o disminuido, lo cual puede aumentar la frecuencia y el grado de consumo del alcohol.

Stromberg y cols. (1998) proponen que la administración repetida de naltrexona a lo largo de 30 o 60 días es igualmente efectiva en la reducción del consumo de alcohol en ratas, mientras se encuentran bajo el tratamiento. Aunque, el consumo incrementa en ambos grupos cuando ésta se suspende, este incremento es atenuado en las ratas que se les administró naltrexona por 60 días. Lo cual pone en evidencia, el efecto de la duración del tratamiento como estrategia farmacológica

Otros estudios (Sinclair, 1989, Sinclair, 1990) han mostrado que los antagonistas opioides tienen que ser administrados cuando el individuo consume alcohol para producir resultados positivos. Si el alcohol es consumido mientras la naltrexona está presente, la conducta de consumo de alcohol es extinguida (Parkes & Sinclair, 2000, Sinclair, 2001) debido a que el consumo de alcohol ya no es tan reforzante para el sujeto. En una revisión sobre las diferentes maneras de usar la Ntx, Sinclair (2001) sugiere que los animales tiene que beber alcohol mientras los receptores opioides se encuentran bloqueados, esto produce un decremento progresivo en el consumo del alcohol, el cual persiste aún cuando el medicamento ya no es administrado. En contraste al administrar los mismos antagonistas durante la abstinencia no se reducen los subsecuentes consumos, por el contrario, tienden a incrementarse.

Sinclair (1996) encontró que la naltrexona redujo la recaída durante 6 meses en un grupo en que la mayoría de los pacientes admitieron seguir consumiendo alcohol mientras tomaban

naltrexona, en contraste, en otro grupo, la naltrexona no previno la recaída en los pacientes en abstinencia mientras estaban con el antagonista.

A pesar de que la administración de Ntx ha mostrado eficacia en el tratamiento del alcoholismo, uno de los problemas importantes que han opacado su éxito es que al interrumpir el tratamiento con Ntx se observa el restablecimiento casi de inmediato del consumo del alcohol, tanto en los estudios con humanos como con animales, lo cual en parte puede estar relacionado con la asociación o disociación del efecto del antagonista opioide con el consumo de alcohol durante el tratamiento y con la posible presencia de la sobre-regulación de receptores a opioides una vez que el tratamiento ha sido suspendido.

Considerando la frecuente reincidencia en el consumo de alcohol, es probable que en la práctica médica el fármaco se administré en repetidas ocasiones. Sin embargo, no se han encontrado estudios en los cuales se analice qué sucede cuando la Ntx se ha administrado en repetidas ocasiones. La presencia de una facilitación acumulada a lo largo del tratamiento en el consumo del alcohol o no, aún está por determinarse.

Con base en estos datos consideramos importante estudiar el posible efecto diferencial de la asociación o disociación de estímulos farmacológicos como son los antagonistas opioides y el alcohol así como el efecto intermitente de la Ntx sobre la cantidad de alcohol consumida durante y al termino del tratamiento.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto de la asociación y disociación farmacológica entre un antagonista opioide y el alcohol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el consumo de alcohol voluntario en la rata macho cuando se les administra naltrexona (Ntx) disociada al consumo de alcohol.
- Estudiar el consumo de alcohol voluntario en la rata macho cuando se les administra naltrexona (Ntx) asociada al consumo de alcohol con diferentes dosis.

- En los dos casos anteriores estudiar el efecto del tratamiento intermitente con Ntx en el consumo del alcohol.

HIPÓTESIS

Cuando el consumo de alcohol y la Ntx se presenten disociados uno del otro se observará un aumento en el consumo del etanol en el periodo inmediato posterior al tratamiento con el antagonista opioide.

Cuando el consumo de alcohol ocurra junto con el tratamiento con Ntx se observará un decremento durante el tratamiento y un incremento no superior a la línea base en el consumo de alcohol en el periodo inmediato posterior al tratamiento con el antagonista opioide.

Al administrarse la Ntx de manera intermitente y disociada del consumo del alcohol, tenderá a incrementarse este último a lo largo de las 4 semanas.

Al administrarse la Ntx de manera intermitente y asociada al consumo del alcohol, el consumo de este último se mantendrá estable a lo largo de las 4 semanas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Material y Método

Se utilizaron 6 grupos (Tab. 1) con 10 ratas machos Wistar adultos cada uno. Los sujetos se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12-12hrs, con agua y alimento ad libitum durante todo el experimento. Desde la edad de inicio del experimento se les colocó en cajas individuales.

El consumo de alcohol (10%) fue voluntario, es decir los sujetos tenían acceso a un bebedero con una solución de alcohol y otro con agua. Todos los sujetos pasaron por un período de inducción al alcohol en el cual se les fue aumentando paulatinamente la concentración de etanol iniciando con 6% hasta llegar al 10%, cada concentración se les daba por dos días.

Se evaluó el consumo de alcohol durante un período de línea base previo al tratamiento con Ntx, pre-tratamiento (pre-T) de 5 días para el experimento 1 y 7 días para los experimentos 2 y 3, donde tuvieron acceso al alcohol (10%) voluntario. Después de este periodo común para todos los grupos se inició con el tratamiento.

Tratamiento

Para llevar a cabo el tratamiento con naltrexona (Ntx) se dividieron los 6 grupos (Ntx1, Ctrl1, Ntx2, Ctrl2, Ntx3, Ctrl3) en tres experimentos (1,2 y3):

El experimento 1 estaba formado por los grupos Ntx1 y Ctrl1. Se ha descrito que la Ntx pudiese tener un efecto inhibitorio indiscriminado en el consumo de líquidos (Goodwin et al, 2001) por tal motivo se evaluó la cantidad de agua consumida en un período de línea base (LB) durante 7 días (este periodo es únicamente para este experimento, ya que durante el periodo de administración de Ntx los sujetos tenían acceso a agua), posteriormente a los sujetos Ntx1 se les administró subcutáneamente 2mg/kg de Ntx/día/7 días la cual se efectuaba a las 19:30hrs, con el fin de afectar el periodo nocturno donde los sujetos beben más (Juárez & Barrios De Tomasi, 1999) en este (T) periodo tenían libre acceso a agua y alimento. Posteriormente tuvieron 5 días de acceso voluntario al alcohol (PT) es decir, agua, solución de alcohol (10%) y alimento a libre demanda. El grupo Ctrl1 paso por el mismo procedimiento que Ntx1 sustituyendo Ntx por vehículo (Cuadro 1).

Experimento 2, estuvo formado por los grupos Ntx2 y Ctrl2. Al grupo Ntx2 se le administró 2mg/kg de Ntx/día/7 días (T) seguido de 7 días de descanso de Ntx (PT). Ctrl2 mismo procedimiento que Ntx2 sustituyendo Ntx por vehículo. Estos dos grupos estuvieron expuestos al

acceso voluntario de alcohol permanente es decir, antes, durante y después del tratamiento con Ntx (Cuadro 2).

Experimento 3, integrado por los grupos Ntx3 y Ctrl3, los cuales pasaron por el mismo procedimiento que los grupos Ntx 2 y Ctrl2, con la excepción de que al grupo Ntx3 se le administró una dosis de 10mg/kg/7días de Ntx (Cuadro 3).

Estos procedimientos se repitieron 4 veces sucesivas en los 3 experimentos. Por lo que finalmente quedó: 7 días de línea base (LB), 7 días de administración con Ntx o Veh (T1), 5 días (Exp 1) o 7 días (Exp 2 y 3) de descanso de tratamiento (PT1), 7 días de tratamiento (T2), 5 días (Exp 1) o 7 días (Exp 2 y 3) de descanso de tratamiento (PT2) y así sucesivamente hasta tener las 4 semanas de cada periodo.

Se registró el peso corporal tres veces a la semana para evaluar si había alguna variabilidad a lo largo de los experimentos.

Diariamente se les midió el consumo de agua o agua/alcohol según fuera el periodo o el grupo en el que se encontraran, así como también el alimento.

Todos los análisis de varianza fueron de dos factores, mixtos y se usó la prueba de Duncan para análisis a posteriori, tomando en cuenta un nivel de significación de $p \leq 0.05$, en todos los casos.

Para evaluar los consumos de: alcohol (gr/kg), agua (w) con acceso a alcohol, agua durante la Ntx, alimento y peso corporal se utilizaron análisis de varianza de dos factores: grupo (Ntx, Ctrl) X periodo.

Considerando que uno de los objetivos de este trabajo es buscar la estrategia adecuada para administrar el antagonista opioide con el fin de obtener un mejor grado de éxito en la acción inhibitoria sobre el consumo de alcohol, se realizó el análisis de diferencias de consumo de alcohol (gr/kg) con las diferentes estrategias farmacológicas usadas en los 3 experimentos.

Cuadro 1

Experimento 1	LB (W)	LB (Alc V)	T	PT	Después de 4 sesiones de T y PT intercaladas sucesivamente	
Ntx1	Acceso a W (7 días)	Alc V (5 días)	Ntx(2mg/kg) sin acceso a Alc V (7días)	Acceso Alc V (5 días)	Acceso a W (7 días) (PTfw)	Acceso a Alc V (5 días) (PTfalc)
Ctrl1	Acceso a W (7 días)	Alc V (5 días)	Vehículo sin acceso a Alc V (7 días)	Acceso Alc V (5 días)	Acceso a W (7 días) (PTfw)	Acceso a Alc V (5 días) (PTfalc)

Cuadro 2.

Experimento 2	LB	T	PT	
Ntx2	Acceso a Alc V (7 días)	Ntx (2mg/kg) y acceso a Alc V (7días)	Acceso Alc V (7días)	4 sesiones de T y PT intercaladas sucesivamente
Ctrl2	Acceso a Alc V (7 días)	Vehículo y acceso a Alc V (7días)	Acceso Alc V (7días)	4 sesiones de T y PT intercaladas sucesivamente

LB= Línea base, T= Tratamiento, PT= Postratamiento, PTf= postratamiento final

Alc V= alcohol voluntario (alcohol + agua), W= agua

Periodos de tratamientos (T1, T2, T3 y T4, equivalente a 4 semanas)

Periodos de post-tratamientos (PT1, PT2, PT3 y PT4, equivalente a 4 semanas)

Cuadro 3.

Experimento 3	LB	T	PT	
Ntx3	Acceso a Alc V (7 días)	Ntx (10mg/kg) y acceso a Alc V (7días)	Acceso Alc V (7días)	4 sesiones de T y PT intercaladas sucesivamente
Ctrl3	Acceso a Alc V (7 días)	Vehículo y acceso a Alc V (7días)	Acceso Alc V (7días)	4 sesiones de T y PT intercaladas sucesivamente

LB= Línea base, T= Tratamiento, PT= Postratamiento, PTf= postratamiento final

Alc V= alcohol voluntario (alcohol + agua), W= agua

Periodos de tratamientos (T1, T2, T3 y T4, equivalente a 4 semanas)

Periodos de post-tratamientos (PT1, PT2, PT3 y PT4, equivalente a 4 semanas)

Variables

Dependientes

- Consumo de alcohol
- Consumo de agua
- Consumo de alimento
- Peso corporal

Independientes

- Tratamiento con Ntx sin acceso simultáneo a alcohol
- Tratamiento con Ntx con acceso simultáneo a alcohol
- Diferentes dosis de Ntx

RESULTADOS

Experimento 1, administración periódica de Ntx (2mg/kg) sin exposición al alcohol y acceso voluntario al mismo en el periodo posterior al tratamiento (Ntx1).

Consumo de alcohol en gr/kg de peso corporal.

El análisis de grupos (Ntx, Ctrl) X periodos (LB, PT1, PT2, PT3 y PT4) para el consumo de alcohol, mostró que el factor grupos no es significativo. El factor periodos fue significativo ($F(5,90)=3.72$, $p=0.0041$) indicando que el consumo de alcohol de la LB es menor a PT2 y PT4, a su vez PT2 mayor a PT1.

La interacción (Fig 1) ($F(5,90)=2.38$, $p=0.044$); mostró que el consumo de alcohol en cada uno de los pos-tratamientos de Ntx fue significativamente mayor a su respectivo control y a la LB. El PTf del grupo Ntx es significativamente mayor a LBNtx, en cambio la LB del grupo Ctrl no difiere del periodo PTf.

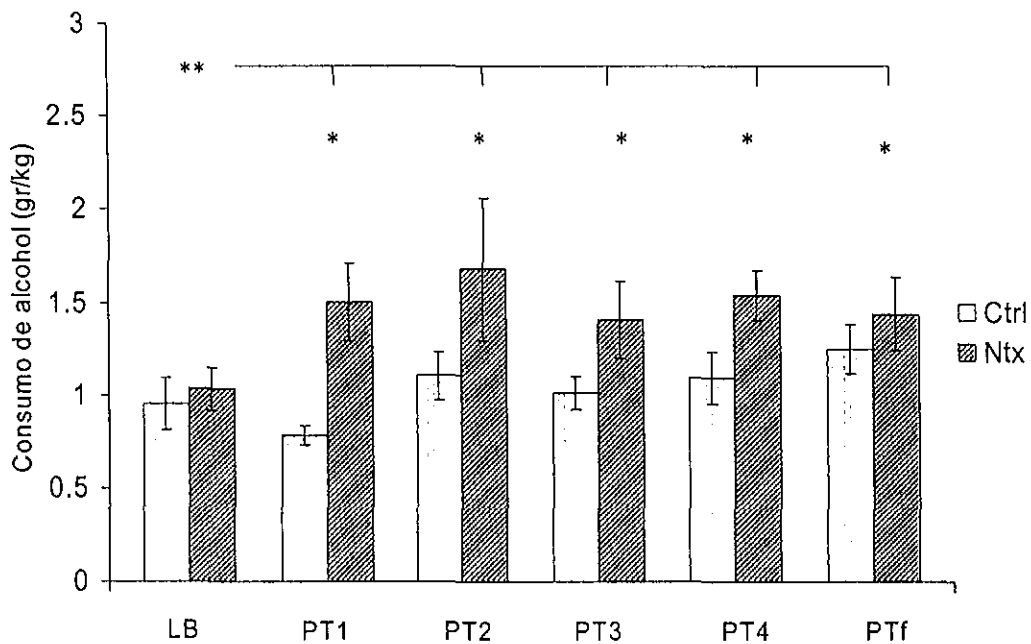


Fig 1.- Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para el grupo control (Ctrl) y Naltrexona (Ntx) en los periodos de línea base (LB), y los postratamientos de la semana 1 a la 4 incluyendo el postratamiento final (PT1, PT2, PT3, PT4 y PTfale).

** LBNtx, < PT1Ntx, PT3Ntx, PT2Ntx, PT4Ntx, PTfNtx * PT1Ntx > PT1Ctrl
* PT2Ntx > PT2Ctrl * PT3Ntx > PT3Ctrl * PT4Ntx > PT4Ctrl

Consumo de agua durante el tratamiento con Ntx

En el análisis de grupos (Ntx, Ctrl) X periodo (LB, T1, T2, T3, T4) para el consumo de agua durante los periodos sin acceso a alcohol, mostró que no hay diferencia significativa entre grupos, sin embargo para el factor periodos si se encuentran diferencias ($F(5,90)=65.02$, $p \leq 0.0001$), indicando que T4 es significativamente mayor a LB, T1, T2 y PTf; LB y T1 son significativamente menores a T2, T3 y PTf y LB a T1.

El ANOVA mostró la interacción (Fig. 2) significativa ($F(5,90)=5.01$, $p=0.0004$). Se encontró que el consumo de agua es significativamente menor en LBNtx y LBCtrl que sus respectivos T2, T3, T4 y PTfw; la LBCtrl también es menor a T1Ctrl. El PTfCtrl es mayor que T1Ctrl y menor que T2Ctrl y T4Ctrl. T1ntx significativamente menor a T2Ntx, T3Ntx, T4Ntx, PTfNtx, T1Ctrl y T2Ntx a T3Ntx, T4Ntx, PTfNtx, y T2Ctrl.

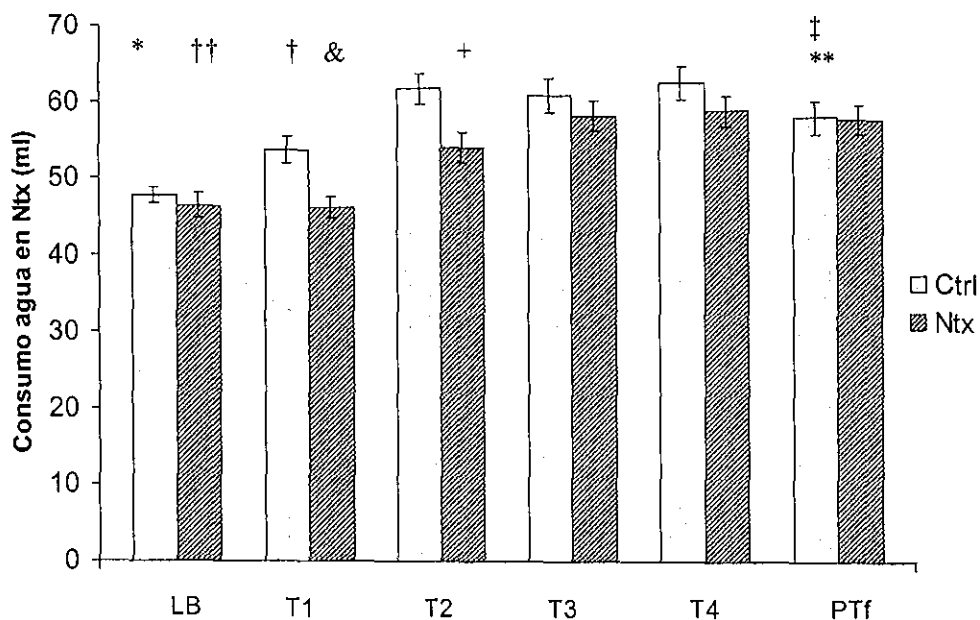


Fig 2. Consumo de agua en ml durante la administración de Ntx ($M \pm ES$) para el grupo Ctrl y Ntx en línea base (LB), y los periodos de tratamiento de la semana 1 a la 4 y el periodo final (T1, T2, T3, T4 y PTfw).

- * LBCtrl < T1Ctrl, T2Ctrl, T3Ctrl, T4Ctrl, PTfCtrl
- †† LBNtx < T2Ntx, T3Ntx, T4Ntx, PTfNtx
- † T1Ctrl < T2Ctrl, T3Ctrl, T4Ctrl
- & T1Ntx < T2Ntx, T3Ntx, T4Ntx, PTfNtx, T1Ctrl
- ‡ PTfCtrl > T1Ctrl
- ** PTfCtrl < T2Ctrl, T4Ctrl
- + T2Ntx < T3Ntx, T4Ntx, PTfNtx, T2Ctrl

Consumo de agua durante el acceso a alcohol voluntario y posterior al tratamiento con Ntx o vehículo.

El análisis de grupo X periodo (LB, PT1, PT2, PT3, PT4, PTf) para el consumo de agua durante el acceso a alcohol voluntario, indicó ausencia de diferencias para el factor A, grupo. El factor B, periodo ($F(5,90)=5.31$, $p = 0.0003$), indicó que PT1 es significativamente menor a todos los demás periodos. Para la interacción de consumo de agua con acceso a alcohol ($F(5,90)=2.35$, $p=0.047$), se observa (Fig. 3) que, PT1Ntx es significativamente menor a LBNtx, PT2Ntx, PT3Ntx, PT4Ntx, PTfNtx, y PT1Ctrl al mismo tiempo PT4Ntx significativamente mayor a LBNtx y PT2Ntx.

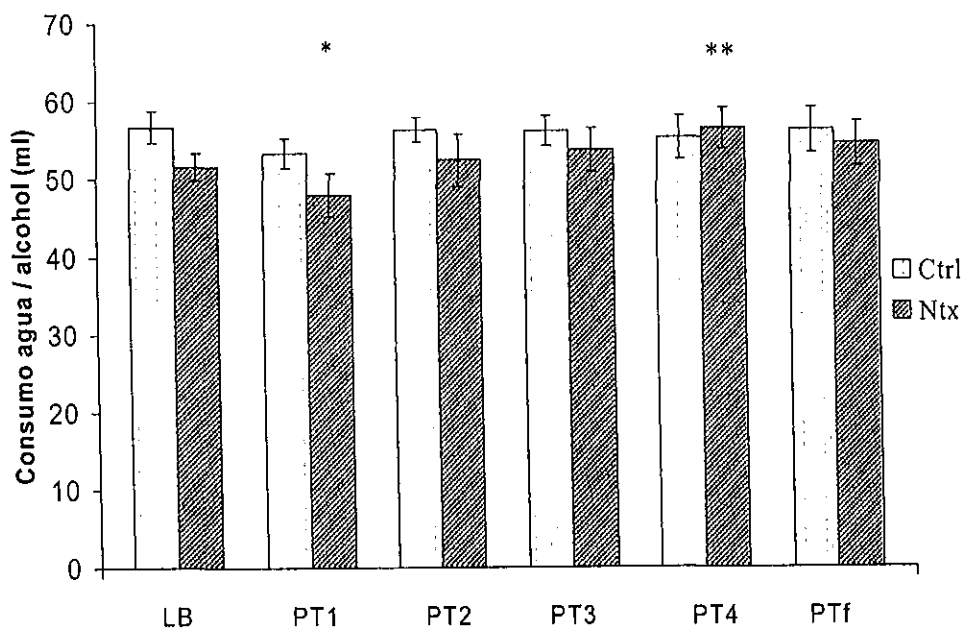


Fig. 3. Consumo de agua durante el acceso al alcohol voluntario en ml, ($M \pm ES$) para los grupos control (Ctrl) y naltrexona (Ntx) en los periodos de línea base (LB), y los postratamientos de la semana 1 a la 4 incluyendo el postratamiento final (PT1, PT2, PT3, PT4 y PTfw).

* PT1Ntx < LBNtx, PT2Ntx, PT3Ntx, PT4Ntx, PTfNtx, PT1Ctrl ** PT4Ntx > LBNtx, PT2Ntx

Consumo de alimento durante el tratamiento con Ntx

Debido a que el alcohol y la Ntx pudieran tener algún efecto residual sobre el consumo del alcohol se realizó un análisis donde al valor de cada uno de los periodos se le restó el valor del periodo contiguo anterior (T1-LB, T2-T1, T3-T2, T4 -T3), este análisis se llevó acabo para cada uno de los experimentos. En el análisis de grupo X periodos se encontró que, el factor A, grupo, no fue significativo, así como tampoco el factor B ni la interacción.

Consumo de alimento durante acceso a alcohol voluntario

En el consumo de alimento durante el consumo de alcohol voluntario también en diferencias, para el análisis de grupos X periodos (PT1-LB, PT2-PT1, PT3-PT2 y PT4-PT3) no se observan diferencias significativas en ninguno de los 3 factores

Peso corporal

Al hacer el registro del peso corporal a lo largo del experimento, se encontró un aumento gradual a través del tiempo, se realizó un análisis de varianza de dos factores, grupo X días (en los que el peso fue registrado), únicamente el factor días fue significativo ($F(79.9,180)=292.64$, $p \leq 0.0001$) la LB es menor que todos los periodos subsecuentes y así cada uno de los siguientes periodos son significativamente menores a los subsecuentes periodos, lo cual es explicable debido al incremento en el peso consecuencia del crecimiento y la edad más no al tratamiento, como se observa en la figura 4.

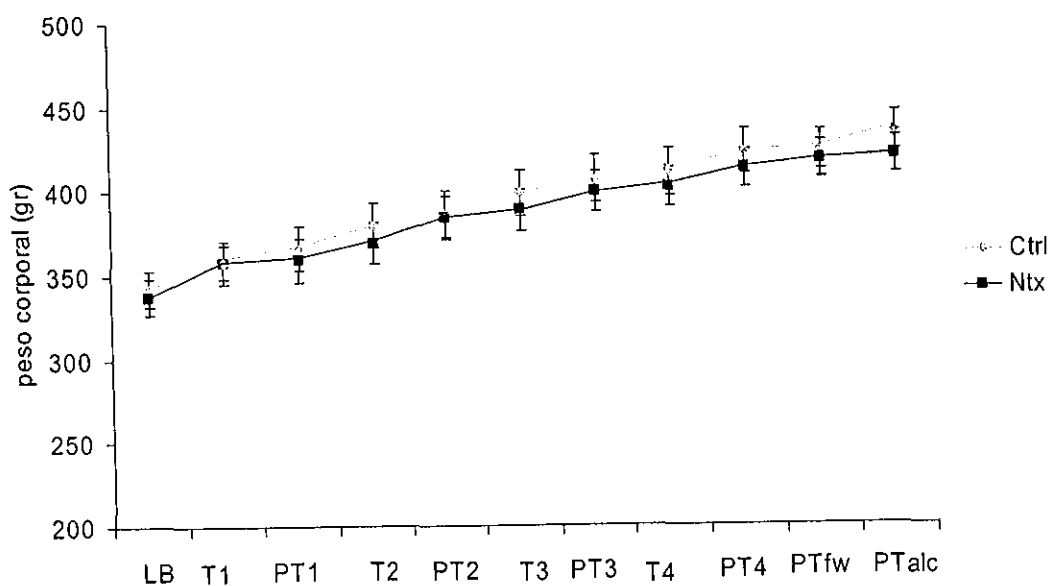


Fig. 4. Peso corporal en gr ($M \pm ES$) para los grupos Control (Ctrl) y Naltrexona (Nx) en los diferentes periodos, tanto durante el tratamiento con Ntx (w) como en los periodos de descanso (alc-w).

Experimento 2, administración periódica de Ntx(2mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx2)

Consumo de alcohol en gr/kg de peso corporal.

El análisis de grupo (Ntx, Ctrl) X periodo (LB, T1, PT1, T2, PT2, T3, PT3, T4 y PT4) no mostró diferencias significativas en el consumo de alcohol, ni en el factor A, grupos, ni en la interacción de los factores analizados (Fig. 5). El factor B, periodos, sí mostró diferencias significativas ($F(8,144)=5.60, p \leq 0.0001$) indicando que T1 es significativamente mayor a LB, PT1, T2, PT2, T3, PT3, T4 y PT4; T2 mayor a PT3 y PT4; T3 mayor PT4; y PT3 significativamente menor a LB, PT1 y T3 (Fig. 6).

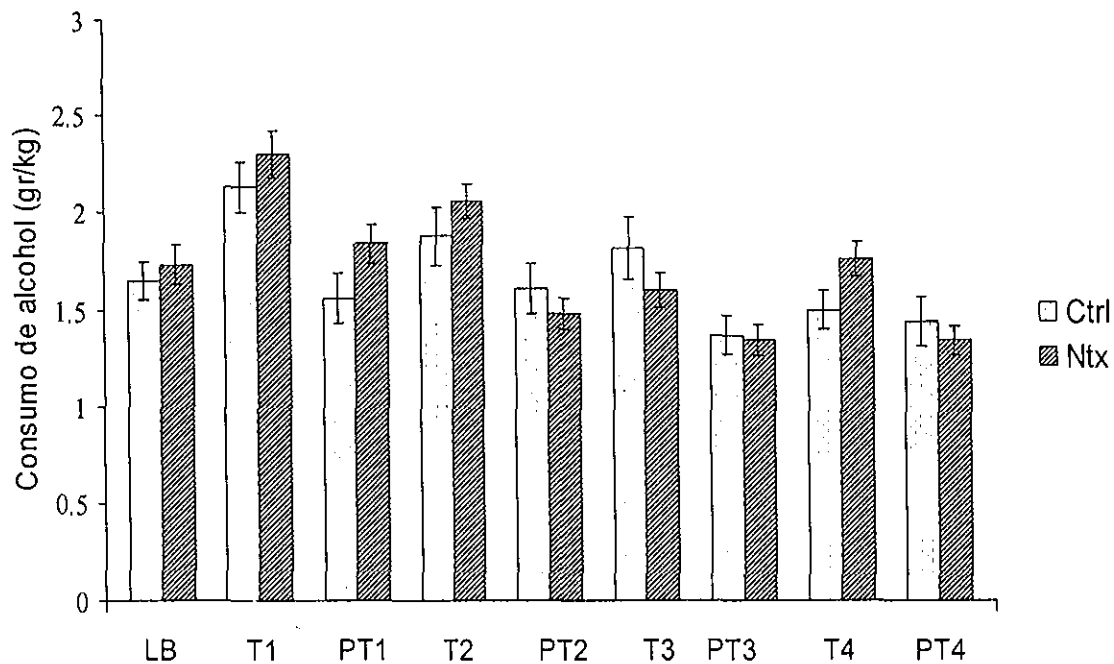


Fig. 5. Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para el grupo control (Ctrl) y Naltrexona (Ntx) en los periodos de línea base (LB), Los periodos de tratamiento (T1, T2, T3, T4) y los postratamientos (PT1, PT2, PT3, PT4), de la semana 1 a la 4.

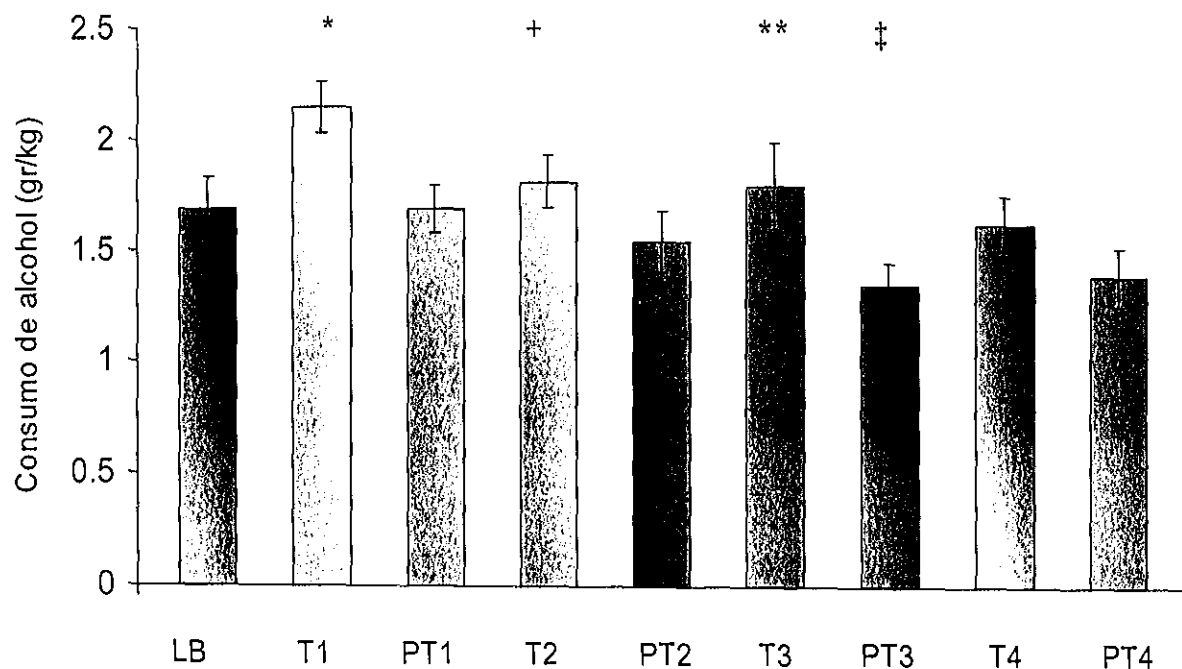


Fig. 6 Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para los periodos de línea base (LB) y los periodos de tratamiento de la semana 1 a la 4 (T1, T2, T3, T4) así como también los postratamientos correspondientes a las mismas semanas (PT1, PT2, PT3, PT4) independientemente del grupo.

* T1 > LB, PT1, T2, PT2, T3, PT3, T4, PT4

+ T2 > PT3, PT4

** T3 > PT4

‡ PT3 < LB, PT1, T3

Consumo de agua con acceso simultaneo a alcohol

En el ANOVA de grupo X periodo para el consumo de agua, se encontró diferencias significativas en el factor B, periodos, ($F(8,144)=7.30, p \leq 0.0001$). En la figura 7 se observa que PT1 es significativamente menor a LB, T1, PT2, T3, PT3, T4, PT4 ; y T2 menor a LB, T1, PT2, T3, PT3, T4, PT4 .

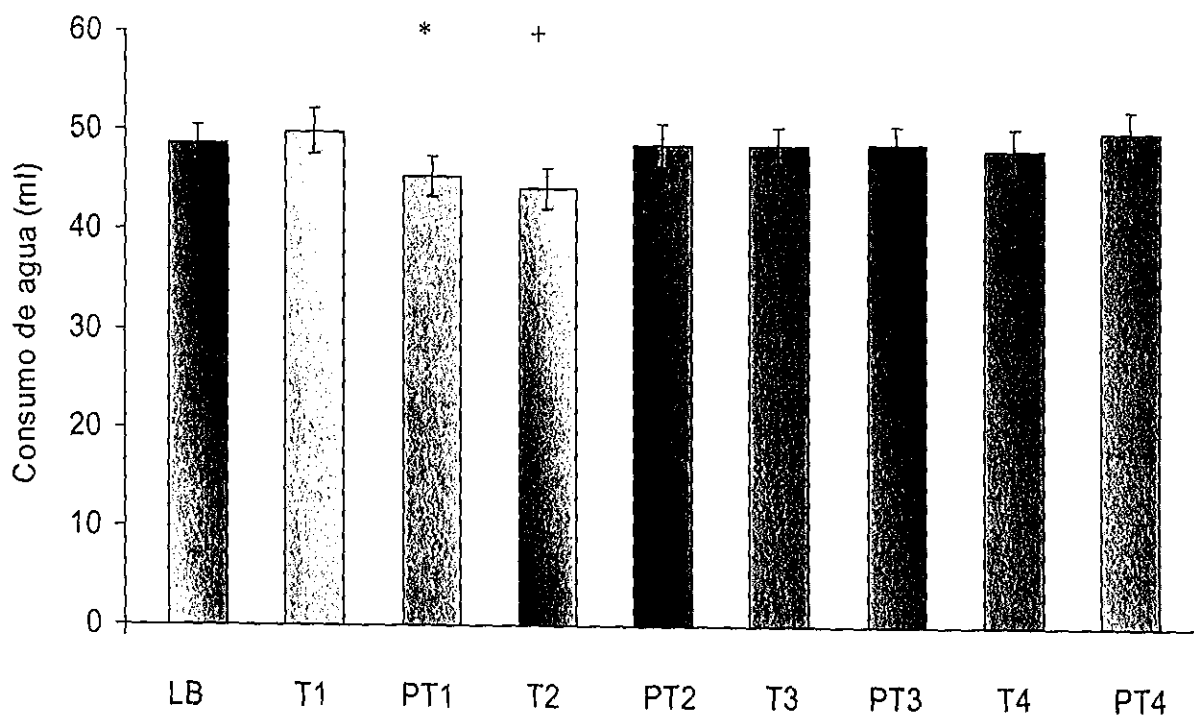


Fig. 7. Consumo de agua en ml con acceso simultaneo a alcohol ($M \pm ES$) para los diferentes periodos independientemente del grupo.

* $PT1 < LB, T1, PT2, T3, PT3, T4, PT4$ + $T2 < LB, T1, PT2, T3, PT3, T4, PT4$

Consumo de alimento

En el análisis de diferencias de consumo de alimento a lo largo de todo el experimento, donde a cada uno de los periodos se le restó el periodo inmediato anterior (T1-LB, PT1-T1, T2-PT1, etc) factor A, grupo y factor B, periodo; se obtuvieron diferencias significativas en el factor B ($F(7,126)=4.99, p \leq 0.0001$) y en la interacción ($F(7,126)=5.33, p \leq 0.0001$). En el factor periodos se observa que T3 es significativamente menor a PT2 y PT4 ; PT3 es significativamente menor PT4.

En la gráfica 8 se representa la interacción grupo X periodos para la diferencia de consumo de alimento. Se observa que T3Ntx es significativamente menor a PT1Ntx, PT2Ntx, PT3Ntx, y PT4Ntx; a su vez T2Ntx y PT3Ctrl son menores a PT1Ntx, PT2Ntx y PT4Ntx; T4Ntx significativamente menor a PT2Ntx y PT4Ntx.

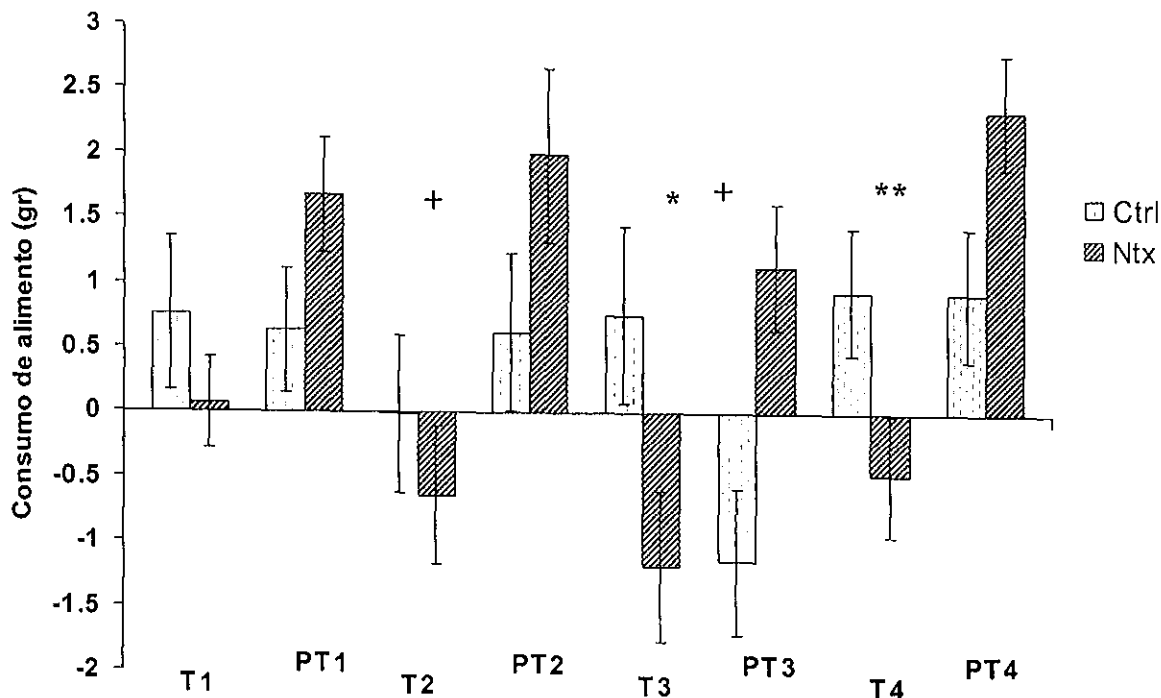


Fig 8. Diferencia de consumo de alimento en gr ($M \pm ES$) para los grupos control (ctrl) y naltrexona (ntx) en los periodos de tratamiento de la semana 1 a la 4 (T1, T2, T3, T4) así como también los postratamientos correspondientes a las mismas semanas (PT1, PT2, PT3, PT4) restado cada uno de ellos a la LB.

* T3Ntx < PT1Ntx, PT2Ntx, PT3Ntx, PT4Ntx

+ T2Ntx y PT3Ctrl < PT1Ntx, PT2Ntx, PT4Ntx.

**T4Ntx < PT2Ntx, PT4Ntx

Peso corporal

Con respecto al peso corporal se realizó el análisis de grupos X periodos a lo largo de todo el experimento, en el cual el factor periodo fue significativo ($F(8,144)=425.10, p \leq 0.0001$). Este resultado estuvo representado por un incremento en el peso en el transcurso del experimento independientemente del grupo, lo cual parece obvio debido al crecimiento y a la edad más no al tratamiento, como se observa en la figura 9.

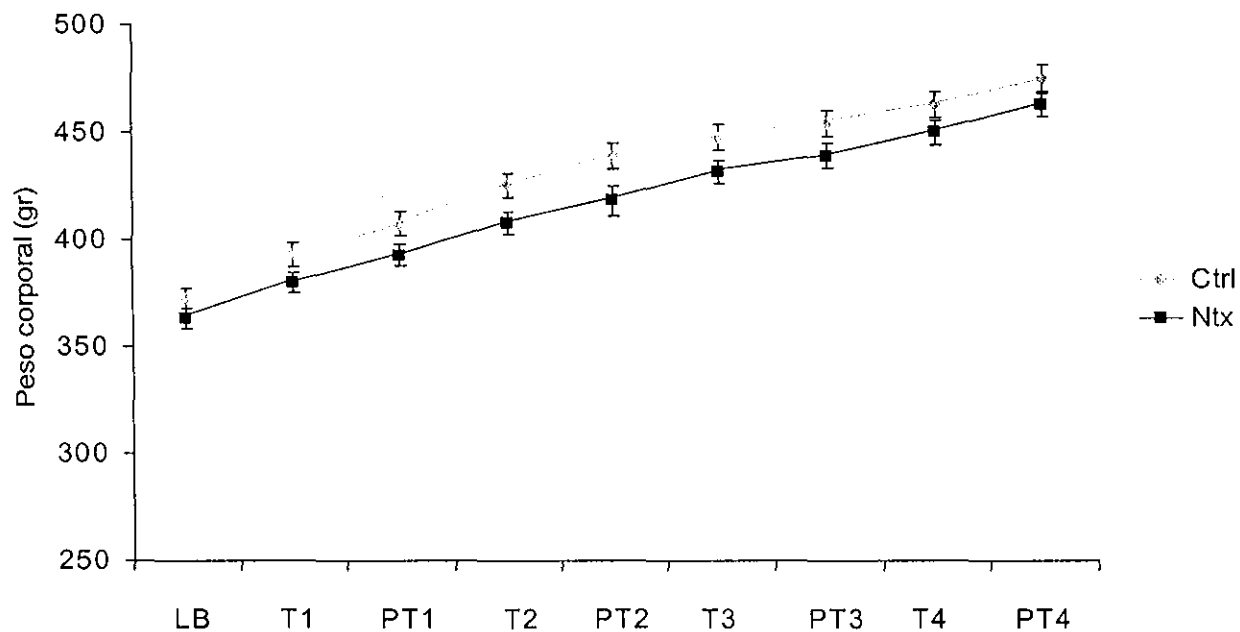


Fig. 9. Peso corporal en gr ($M \pm ES$) para el grupo control (ctrl.) y naltrexona (Ntx) en los diferentes periodos.

Experimento 3, administración periódica de Ntx(10mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx3)

Consumo de alcohol en gr/kg de peso corporal.

En el análisis de grupo (Ntx, Ctrl) X periodo (LB, T1, PT1, T2, PT2, T3, PT3, T4, PT4) no se observan diferencias significativas en el consumo de alcohol, ni en el factor A, grupos, ni en la interacción (Fig. 10), encontrándose diferencias solo en el factor B, periodos, ($F(8,144)=4.11, p \leq 0.0005$). En la figura 11 se muestra que el T1 y T4 son significativamente mayores a LB, PT1, PT2, PT3 y PT4; a su vez PT1 fue menor a T2 y T3.

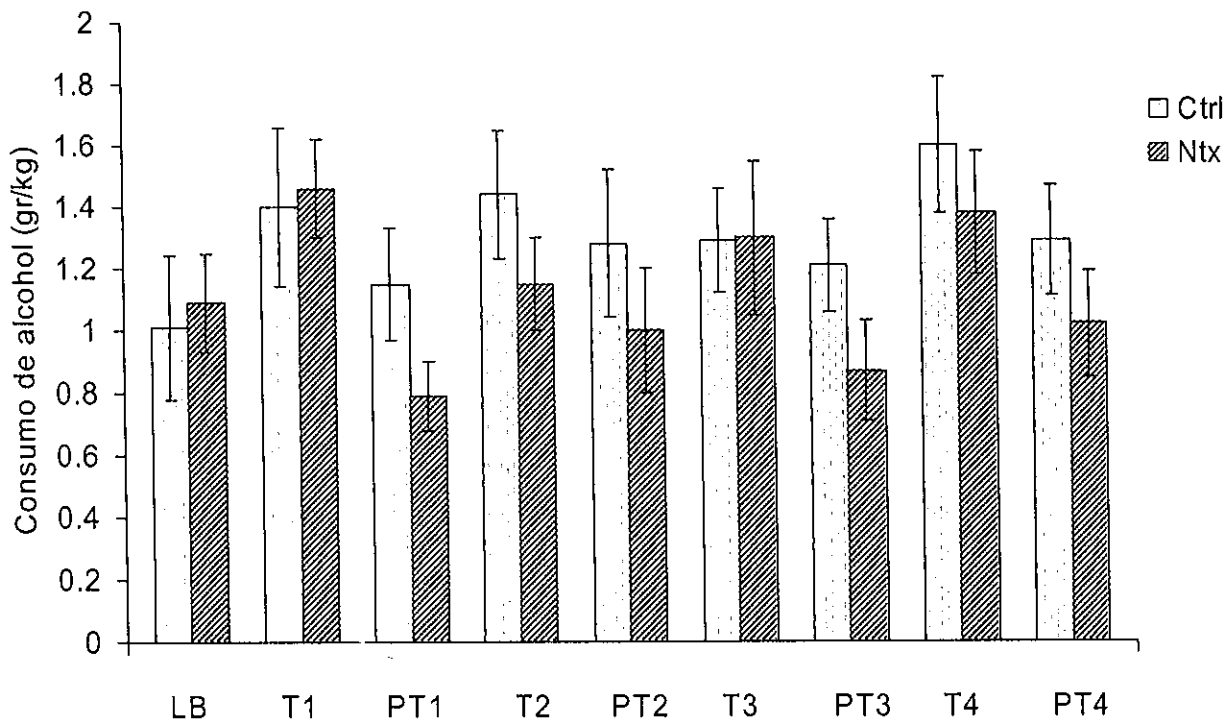


Fig. 10. Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para el grupo control (Ctrl) y Naltrexona (Ntx) en los periodos de línea base (LB), Los periodos de tratamiento (T1, T2, T3, T4) y los postratamientos de la semana 1 a la 4 (PT1, PT2, PT3, PT4).

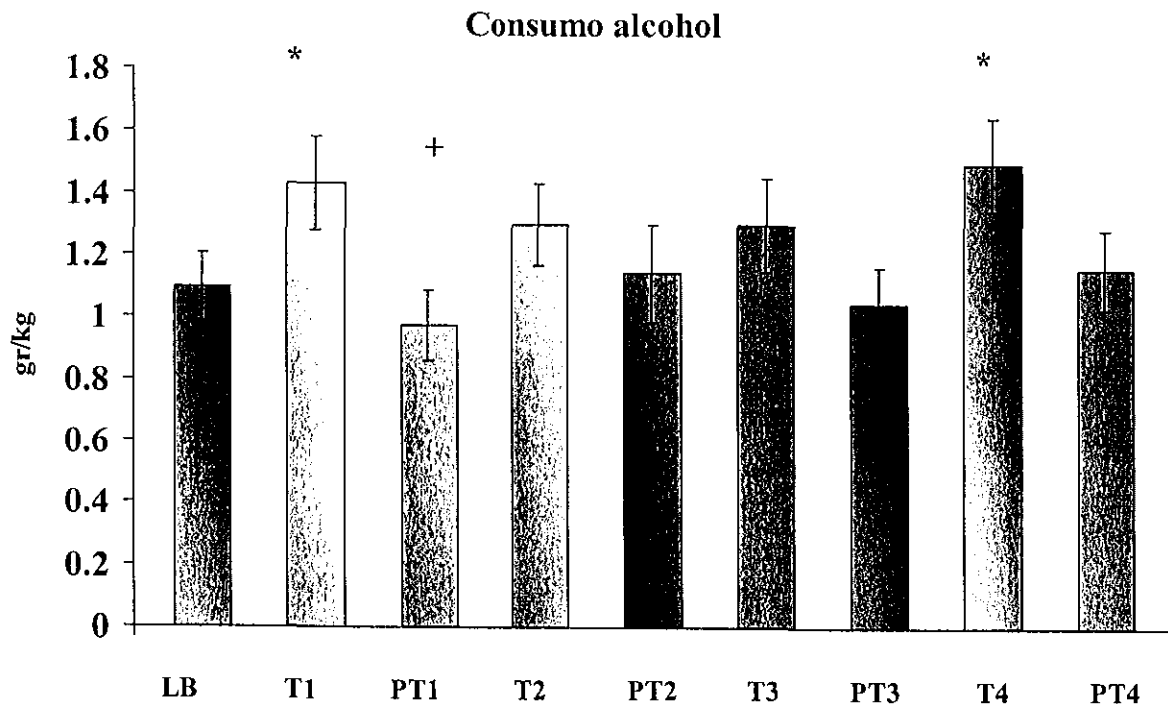


Fig. 11. Consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para los periodos de línea base (LB) y los periodos de tratamiento de la semana 1 a la 4 (T1, T2, T3, T4) así como también los postratamientos correspondientes a las mismas semanas (PT1, PT2, PT3, PT4) independientemente del grupo.

* T1 y T4 > LB, PT1, PT2, PT3, PT4

+ PT1 < T2, T3

Consumo de agua con acceso simultáneo a alcohol

En el ANOVA de grupo X periodo para el consumo de agua cuando también estaba disponible la solución de alcohol, se encontraron diferencias significativas en el factor B, periodos, ($F(8,144)= 4.64, p \leq 0.0001$) y en la interacción ($F(8,144)=6.83, p \leq 0.0001$). Para el factor B, se observó que, la LB es significativamente mayor a T1, T2, PT2, T3, T4; PT1 > a T1, T2, T4; PT3 y PT4 > a T2 y T4. En la interacción, (fig. 12) se observó que LBNtx, PT1Ntx,

PT2Ntx, PT3Ntx, PT4Ntx son significativamente mayores a T1Ntx, T2Ntx, T3Ntx, y T4Ntx; LBCtrl mayor a PT1Ctrl, T2Ctrl, PT2Ctrl, PT3Ctrl, PT4Ctrl; cada uno de los postratamientos del grupo Ctrl son significativamente menores a su respectivo grupo Ntx y el T3Ctrl y T4Ctrl mayor a su respectivo tratamiento de Ntx.

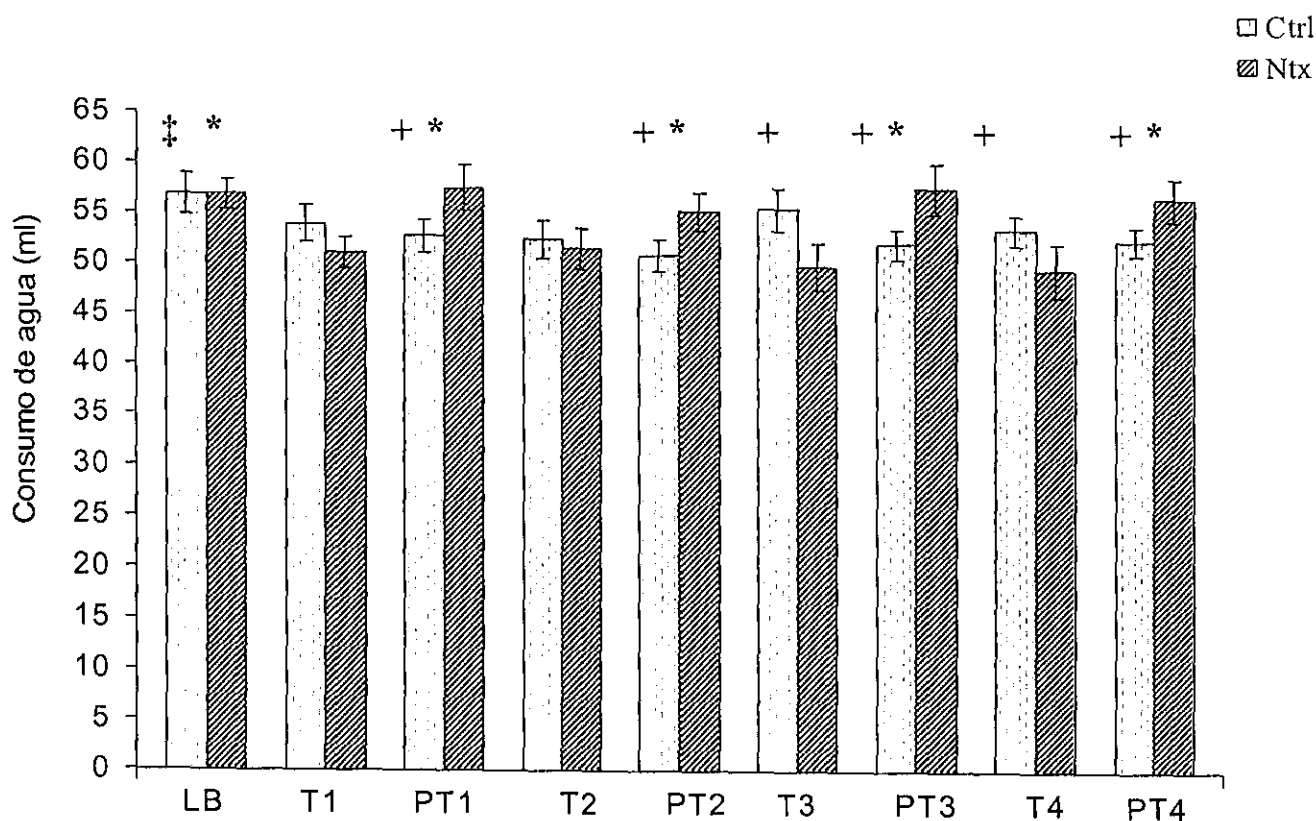


Fig. 12. Consumo de agua en ml con acceso a alcohol voluntario ($M \pm ES$) para los grupos control (Ctrl) y naltrexona (Ntx) en los diferentes periodos.

* LBNtx, PT1Ntx, PT2Ntx, PT3Ntx, PT4Ntx > T1Ntx, T2Ntx, T3Ntx, T4Ntx

‡ LBCtrl > PT1Ctrl, T2Ctrl, PT2Ctrl, PT3Ctrl, PT4Ctrl

+ PT1Ctrl < PT1Ntx,

+ PT2Ctrl < PT2Ntx,

+PT3Ctrl < PT3Ntx,

+ PT4Ctrl < PT4Ntx,

+ T3Ctrl > T3Ntx,

+T4Ctrl > T4Ntx

Consumo de alimento

En el análisis de diferencias de consumo de alimento se encontró diferencias significativas tanto para el factor B, periodos como para la interacción. En el factor B, ($F(7,126)=37.64$, $p \leq 0.0001$) T1, T2, T3 y T4 son significativamente mayores a todos los periodos de postratamiento. En la figura 13 se representa la interacción entre ambos factores, ($F(7,126)=31.23$, $p \leq 0.0001$) cada uno de los tratamientos del grupo Ntx es significativamente mayor a sus respectivo periodo del grupo Ctrl, de manera contraria, PT3Ntx y PT4Ntx son significativamente menores a sus respectivos periodos del grupo Ctrl.

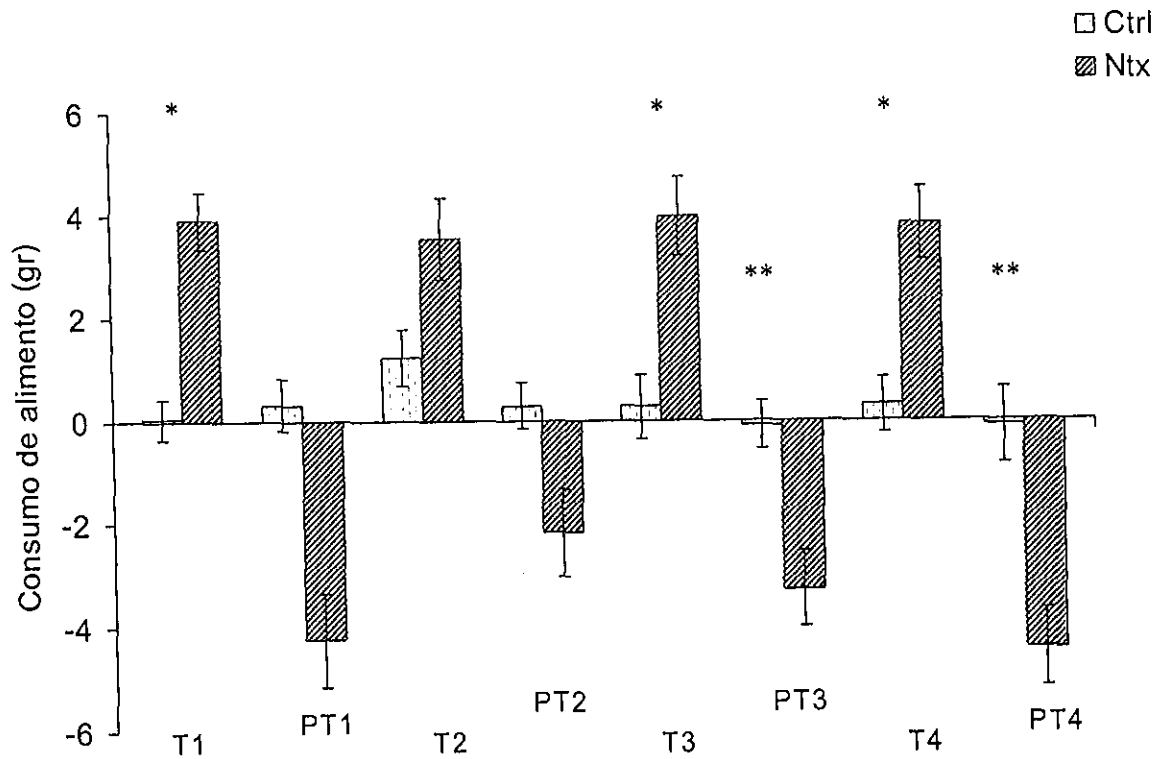


Fig. 13. Diferencias de consumo de alimento en gr ($M \pm ES$) para los grupos Ctrl y Ntx en los diferentes periodos.

* Ntx > Ctrl

** Ctrl > Ntx

Peso corporal

Con respecto al peso corporal se realizó el análisis de grupos X periodos a lo largo de todo el experimento, en el cual el factor periodo fue significativo ($F(8,144)=55.35, p \leq 0.0001$), Este resultado estuvo representado por un incremento en el peso en el transcurso del experimento independientemente del grupo, lo cual parece obvio debido al crecimiento y a la edad más no al tratamiento, como se observa en la figura 14.

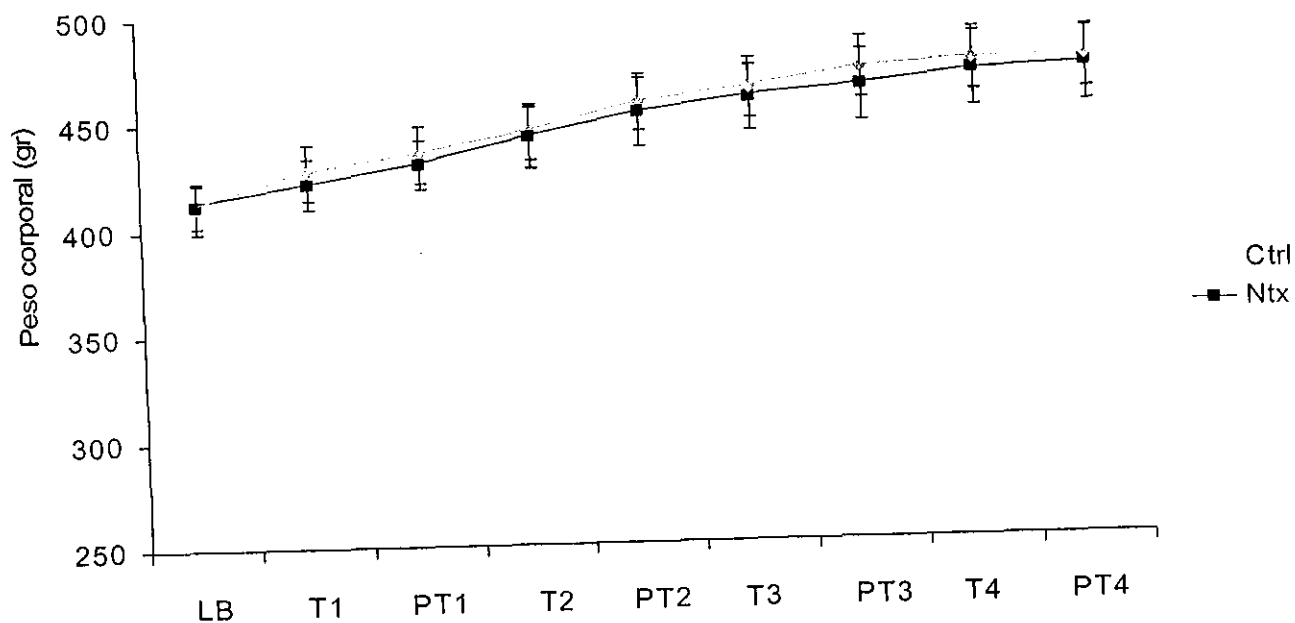


Fig. 14. Peso corporal en gr ($M \pm ES$) para el grupo control (Ctrl.) y naltrexona (Ntx) en los diferentes periodos.

Diferencias de consumo de alcohol en gr/kg de peso corporal, con las diferentes estrategias farmacológicas usadas en los tres experimentos descritos previamente.

Debido a que se encontraron diferencias significativas entre la línea base de los 3 grupos de Ntx de los 3 experimentos, los cuales serán denominados Ntx1 (experimento 1), Ntx2 (experimento 2), y Ntx3 (experimento 3) respectivamente para cada uno de los experimentos, se realizó un análisis de dos factores con las diferencias de consumo de alcohol con respecto a sus propias líneas bases. Considerando las diferentes metodologías de los 3 experimentos el periodo analizado para estos fines fue el PT, ya que los postratamientos coincidían con el acceso al alcohol en los 3 experimentos. Factor A, grupos (Ntx1, Ntx2, Ntx3) y factor B, periodo (PT1, PT2, PT3, PT4) en el cual encontramos diferencias significativas en el factor A y en la interacción. Para A ($F(2,81)=4.74$, $p \leq 0.01$), se observa que Ntx1 es significativamente mayor a Ntx2 y Ntx3 de manera global independiente de los periodos; en la interacción ($F(6,81)=2.59$, $p \leq 0.05$), (Fig. 15) se obtuvo que las diferencias de PT1, PT2, PT3, PT4 para el experimento 1 (Ntx1) fueron significativamente mayores a los respectivos periodos para los experimentos 2 (Ntx2) y 3 (Ntx3); así como también la diferencia de PT1 para Ntxc2 fue significativamente mayor al respectivo periodo del experimento 3. Con respecto a las diferencias entre periodos se encontró que PT2Ntx1 es significativamente mayor a todos los periodos de Ntx2 y Ntx3; PT1Ntx1, PT4Ntx1 son significativamente mayores a PT2Ntx2, PT3Ntx2, PT4Ntx2 y a todos los postratamientos del experimento 3 y a su vez PT3Ntx2 significativamente mayor a PT2Ntx2, PT3Ntx2, PT4Ntx2, PT1Ntx3, PT3Ntx3.

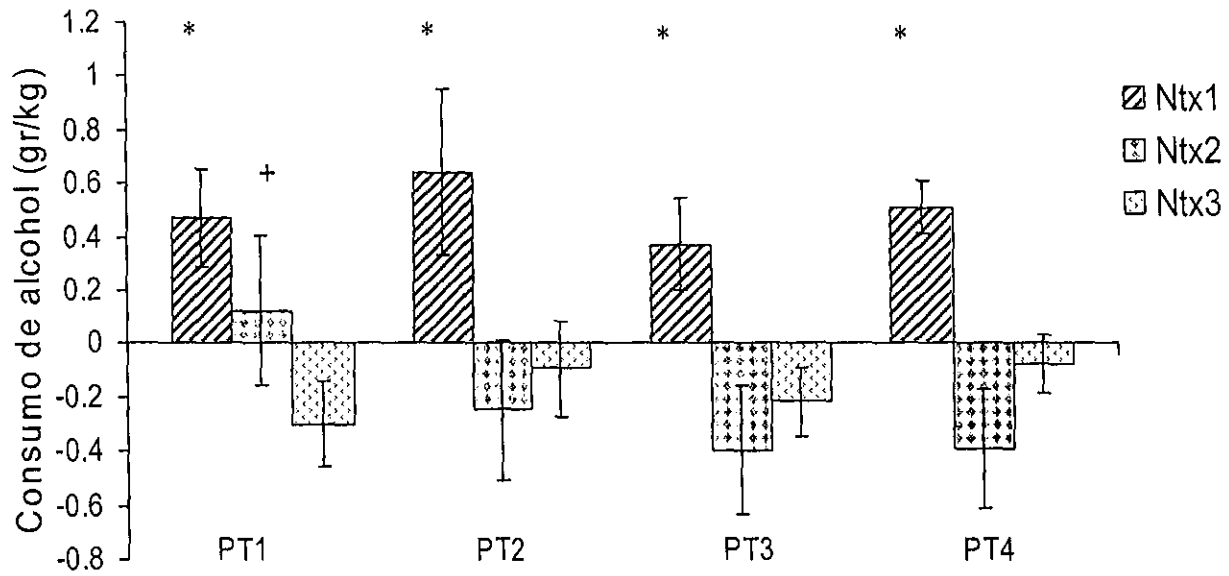


Fig 15. Diferencias de consumo de alcohol en gr/kg ($M \pm ES$) para los tres grupos con Ntx en los cuatro periodos de postratamientos

* Ntx1 > Ntx2, Ntx3

+ Ntx2 > Ntx3

Diferencias entre periodos

PT2Ntx1 > PT1Ntx2, PT2Ntx2, PT3Ntx2, PT4Ntx2, PT1Ntx3, PT2Ntx3, PT3Ntx3, PT4Ntx3.

PT1Ntx1, PT4Ntx1 > PT2Ntx2, PT3Ntx2, PT4Ntx2, PT1Ntx3, PT2Ntx3, PT3Ntx3, PT4Ntx3.

PT3Ntx1 > PT2Ntx2, PT3Ntx2, PT4Ntx2, PT1Ntx3, PT3Ntx3.

DISCUSIÓN

Experimento 1, administración de Ntx (2mg/kg) sin exposición al alcohol y acceso voluntario al mismo en el periodo posterior al tratamiento (Ntx1).

En los resultados obtenidos se pudo observar que la dosis de Ntx administrada, tuvo efecto en el grupo tratado con este fármaco. Dicho grupo bebió más cantidad de alcohol que el grupo Ctrl siendo significativo en todos los periodos posteriores a la administración de Ntx. En ambos grupos hubo un incremento en el consumo de alcohol al suspender las inyecciones, sin embargo, éste fue significativamente mayor en el grupo con Ntx. Este incremento en el consumo inmediatamente después de que se dejó de administrar el fármaco, se puede explicar de la siguiente manera: se ha descrito que después de 8 días de la administración diaria con Ntx ocurre una sobrerregulación de receptores a opioides (Parkes & Sinclair, 2000; Brady, 2000) incrementando su disponibilidad; por otra parte se conoce que el consumo de alcohol produce un incremento en la liberación de opioides endógenos (Jamensky & Gianoulakis, 1997; Rasmussen, et al, 1998; Gianoulakis & Barcomb, 1987; Thiagarajan, et al., 1989). De esta manera, una mayor disponibilidad de receptores a opioides asociada a un incremento en la liberación opioidérgica debido al consumo de alcohol y a la ausencia de bloqueo de los receptores por parte de la Ntx produciría un mayor efecto gratificante del alcohol. Con una estrategia farmacológica parecida, en algunos aspectos, a la del presente estudio, Reid y cols (1996) utilizaron 3 grupos de ratas Sprague-Dawley machos. El grupo Ctrl recibió placebo por 35 días, un segundo grupo recibió Ntx por el mismo tiempo y a un tercer grupo se le administró Ntx periódicamente, lo cual consistió en un periodo de 5 días de inyecciones con el antagonista opioide y 5 días placebo, sucesivamente hasta alcanzar los 35 días. La dosis administrada de Ntx fue de 10mg/kg inyectada subcutáneamente 30 min antes del acceso a 2hrs diarias al alcohol al 12% (con 0.25% de azúcar) y agua. Encontraron que el grupo con Ntx diaria decrementó el consumo de alcohol durante el tratamiento; en el caso del grupo de Ntx periódica se decrementó el consumo de alcohol en el periodo de inyecciones con Ntx y se recuperó el consumo de línea base con la administración del placebo. A diferencia de Reid y cols, en el presente trabajo, encontramos un incremento en el consumo del alcohol significativamente mayor a la LB en el periodo de descanso de la Ntx; Reid y cols, encuentran un aumento en el consumo de alcohol en el periodo en el que se suspende la Ntx no mayor al consumo de la LB, en nuestro caso los sujetos no tienen acceso al alcohol

durante el tratamiento con Ntx y se les expone al alcohol justamente cuando se les deja de administrar la Ntx, periodo en el cual el sujeto no ha asociado el efecto del fármaco con el alcohol. Por otro lado, Parkes y Sinclair (2000) al administrar 2mg/kg/8 días a ratas AA (línea desarrollada selectivamente para un consumo alto de alcohol) y posteriormente analizando histológicamente los cerebros, encuentran un incremento de receptores a opioides producto de la sobre-regulación de los mismos. Estos resultados permiten sugerir que durante el periodo de descanso de la Ntx, en el presente trabajo, los receptores a opioides se encuentran sobre-regulados y al tener acceso al alcohol y suspender la Ntx se produce un mayor efecto gratificante del alcohol y como consecuencia un mayor consumo.

Durante el periodo de administración de la Ntx o vehículo (sin acceso al alcohol) se observó un incremento en el consumo de agua en ambos grupos con respecto a la LB. Sin embargo esta tendencia de incremento del consumo se vió atenuada con la administración de Ntx, diferencia que fue significativa entre grupos en los periodos T1 y T2. Al menos en el grupo control, esta tendencia al incremento en el consumo de agua parece estar asociada a la manipulación durante los periodos de inyecciones ya que el consumo se reduce significativamente una vez que las inyecciones se han suspendido. El decremento en el consumo del grupo Ntx con respecto al grupo Ctrl, se pudo deber a que el sistema opioide esta involucrado en funciones de regulación en la ingestión de líquidos a través de la atenuación de las propiedades reforzantes causando un cambio subsecuente en la palatabilidad (Gardell, et al 1996; Gonzalez, y Weiss, 1998; Goodwin, et al., 2001), lo cual puede influir en el consumo de dicho líquido.

En el análisis de consumo de agua con acceso al alcohol en los periodos de descanso de Ntx o vehículo se pudo observar que PT1 es significativamente menor a LB, PT2, PT3, PT4 y PTfw. Aunque desconocemos la causa de este efecto, parece estar asociado al inicio del procedimiento experimental ya que este efecto ocurrió independientemente del grupo.

La Ntx no afectó el peso corporal, ni al consumo de alimento.

Experimento 2, administración periódica de Ntx(2mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx2)

En los resultados obtenidos en el experimento 2, no se observó ninguna variación significativa en el consumo de alcohol voluntario con el tratamiento de Ntx, lo contrario a lo que

se ha descrito en la literatura donde se encuentra un decremento en el consumo aún con dosis más bajas (Stromberg et al, 1998; Williams & Woods, 1999; Coonfield, Hill, Kaczmarek, Ferraro III, & Kiefer, 2002). Posiblemente en este caso no encontramos dicho decremento debido a que la metodología es diferente a la de otros autores. Otros investigadores utilizan distintas estrategias farmacológicas, entre ellas, inmediatamente después de inyectar la Ntx los sujetos tienen acceso al alcohol durante un tiempo restringido 1, 2 o 3 hrs (Stromberg et al., 1998; Williams & Woods, 1998; Hill & Kiefer, 1997; Coonfield, et al., 2002; Gardell et al., 1996) considerando que la Ntx tiene una vida media de 2.7 ± 1.0 hrs (González & Brogden, 1988), este procedimiento incrementaría la probabilidad de asociar el efecto de la Ntx con los efectos del alcohol. En nuestro caso tratamos de apearnos lo mejor posible a lo que sucede en clínica donde los sujetos tienen acceso voluntario al alcohol 24hrs y el tratamiento habitual es una sola dosis de Ntx al día. Anteriormente realizamos en el laboratorio un experimento (datos no publicados) en el cual se inyectaba a la rata con 2 mg/kg de Ntx e inmediatamente después se les introducía al dipsómetro (equipo que detecta el tiempo real en el que los sujetos tienen acceso al bebedero (alcohol o agua)) con acceso al alcohol las 24hrs, en este estudio encontramos que se reduce el consumo de alcohol en las 3-4hrs siguientes a la administración de la Ntx y posteriormente se recupera el consumo inclusive en mayor cantidad que lo observado en el grupo ctrl, esta podría ser la causa por la cual no encontramos decremento en el consumo de alcohol debido a que los sujetos posiblemente compensaban su ingestión en otro horario posterior a estas 3-4hrs. En este trabajo únicamente se observó que varió el consumo de alcohol en el periodo de T1 para ambos grupos, el cual coincidió con el periodo de inicio de inyecciones.

En el análisis de consumo de agua se observó, un decremento en PT1 y T2 independientemente del grupo, pero esto no se puede atribuir a variaciones en el consumo de alcohol o de alimento; además en el resto de los periodos de tratamiento y pos-tratamiento no se observó dicho decremento.

Con respecto a los resultados obtenidos en el consumo de alimento se obtuvo que independientemente del grupo, T3 es significativamente menor a los periodos PT2 y PT4; y PT3 a PT4 esta diferencia no la podemos atribuir a los efectos de la Ntx posiblemente pueda deberse al crecimiento de los sujetos más que a la manipulación farmacológica o a los periodos de descanso, esto se manifiesta además con el incremento de peso de los sujetos. Analizando la interacción en el consumo de alimento en el grupo Ntx, se observa que T3Ntx es

significativamente menor a PT1Ntx, PT2Ntx, PT3Ntx, y PT4Ntx; a su vez T2Ntx y PT3Ctrl son menores a PT1Ntx, PT2Ntx y PT4Ntx; T4Ntx significativamente menor a PT2Ntx y PT4Ntx. Se sabe que los opioides juegan un rol importante en la modulación de los aspectos del sabor, haciendo la comida, más reforzante. (Cooper & Kirkham, 1993). Se observó que se decrementó el consumo de alimento en 3 de los 4 periodos de tratamiento, probablemente debido a que, como se ha descrito, las β -endorfinas están involucradas en la regulación del consumo de alimento (Marks-Kaufman, Balmagiya & Gross, 1984) y al bloquear el sistema opioide endógeno con el antagonista opioide, posiblemente el alimento disminuye su poder gratificante encontrándose un decremento en su consumo. También se sabe que el mecanismo de reforzamiento mediado por los opioides juega un rol importante en el control de los aspectos hedónicos de la ingestión tanto de líquidos como de alimentos (Yeomans & Gray, 2002) lo cual, apoya la explicación anterior. Es posible que el N Acc pueda estar involucrado tanto en el reforzamiento de las drogas como en el reforzamiento subjetivo derivado de la comida (Bakshi & Kelley, 1993; Kelley, Bless & Swanson, 1996). Por lo que podemos inferir que la Ntx decrementó el consumo de alimento debido a un decremento en el aspecto reforzante del mismo.

En el peso corporal no se observó ningún efecto diferente al propio crecimiento.

Experimento 3, administración periódica de Ntx(10mg/kg) y exposición continua al consumo de alcohol voluntario (Ntx3)

En la literatura se ha reportado que el consumo de alcohol es dosis-dependiente de la Ntx, a mayor dosis mayor efecto (Phillips, Wenger, & Dorow, 1997, Hill & Kiefer, 1997, Gardell et al, 1996, Coonfield et al, 2002) por lo que supusimos que al aumentar la dosis del experimento 2, 5 veces (10mg/kg) produciríamos un decremento en el consumo del alcohol, sin embargo en los resultados encontrados observamos que el consumo de alcohol no se ve afectado por la administración de dicha dosis de Ntx ya que no se observaron diferencias significativas entre grupos. La ausencia de efectos sobre el consumo de alcohol pudiese plantearse en los términos del experimento 2, es decir, que los sujetos posiblemente compensaban su ingestión en otro horario posterior a estas 3-4hrs siguientes a la administración de la Ntx. Como se pudo apreciar el consumo de alcohol presentó oscilaciones a lo largo del estudio; fue consistentemente mayor durante el periodo de inyecciones en ambos grupos, esto pudo deberse a que los sujetos durante

esos periodos pasaron por un periodo de mayor ansiedad y como se sabe el alcohol tiene propiedades ansiolíticas (Matsuguchi, Yoshishige, Shirao & Tsujimaru, 1994, Levenson, Sher, Grossman, Newman & Newlin, 1980) por lo que al consumir más alcohol se decrementa posiblemente la ansiedad o estrés causados por la inyección.

Con respecto al análisis del consumo de agua, se observó en la interacción grupo X periodo un decremento significativo en el consumo de los 2 últimos periodos de tratamiento en el grupo Ntx; en los dos primeros periodos también se observó este efecto, aunque los resultados no fueron significativos. Se ha descrito que la Ntx puede tener un efecto generalizado sobre el consumo de líquidos y no tanto sobre el consumo de alcohol. Goodwin y cols (2001) encontraron que cuando se les administraba inyecciones diarias con 10mg/kg de Ntx (i.p) administrada 1hr antes de que se les apagara la luz a ratas machos Long-Evans y Wistar, midieron el consumo de 24hrs de alcohol al 10%, sacarina al 0.1%, quinina al 0.0006%, sacarina 0.4% + alcohol al 10%, y sacarina 0.4% + quinina 0.04% y observaron que el consumo de agua disminuía con respecto a la LB durante la fase de tratamiento en todos los grupos excepto en aquel que bebió cuando se tenía acceso al agua junto con la solución de sacarina al 0.1%. La reducción en el consumo de agua fue probablemente el resultado en el incremento del consumo de las sustancias saborizadas a las cuales los sujetos tenían acceso voluntario y no hubo recuperación aún cuando la ntx se suspendió. Por otro lado se sabe que la Ntx reduce selectivamente el consumo de los fluidos hacia los cuales se tiene una mayor preferencia (Williams & Woods, 1999). En nuestro experimento se observó una tendencia del grupo Ntx a beber menos agua que Ctrl, posiblemente se debió al efecto de la dosis alta de Ntx ya que el agua seguía siendo el líquido de mayor preferencia y al incrementarse el consumo de alcohol en los periodos de tratamiento, el agua se decrementó.

En el análisis de consumo de alimento se observó lo contrario a lo que se ha descrito en la literatura en donde el uso de los antagonistas opioides decrementa el consumo de alimento (Marks-Kaufman, et al 1984; Jalowiec, et al 1981; Yeomans & Gray, 1997) y disminuye el peso en ratas obesas (Marin-Bivens & Olster, 1999; Jarros & Metzger, 2002). En nuestro caso encontramos que durante el tratamiento con Ntx se observa un incremento en el consumo de alimento con respecto al grupo Ctrl en 3 periodos de tratamiento, aunque durante estos periodos no se observa incremento de peso. El grupo Ctrl no presentó cambios excepto en el PT3Ctrl. El incremento en el consumo de alimento en los sujetos tratados con Ntx probablemente se debió a que esta dosis alta de Ntx redujo en forma significativa las propiedades reforzantes del alimento y

los sujetos continuaban su ingesta, posiblemente con el fin de alcanzar los efectos gratificantes esperados. Además no parece haber un efecto de compensación en los periodos posteriores a los de tratamiento ya que no se encuentran diferencias significativas en los periodos de PT, lo que pudiera deberse a algún efecto sobre el metabolismo que no se ha descrito en la literatura. Este efecto de la Ntx opuesto al comúnmente descrito, pudiese estar asociado a la afectación de diferentes componentes motivacionales relacionados con el sistema opioide. La afectación de la conducta alimenticia apoya que la Ntx puede tener efectos sobre otros estímulos con propiedades reforzantes distintos a los descritos para el alcohol.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Uno de los objetivos de este estudio fue buscar la estrategia adecuada para administrar el antagonista opioide con el fin de obtener un mejor grado de éxito en la acción inhibitoria sobre el consumo de alcohol. En los resultados encontrados, el experimento 1 apoyaría la posible sobre-regulación causada por el antagonista opioide, ya que se observó un incremento en el consumo del alcohol inmediatamente después de que el medicamento es suspendido. En el segundo y tercer experimento no se observó el decremento en el consumo de alcohol que se describe en la literatura tanto a dosis bajas de Ntx, 1mg/kg como altas de 10mg/kg. Reid y cols (1996) concluyen que los niveles de supresión del consumo de alcohol están más relacionados a la dosis de la Ntx más que a la experiencia de los efectos con Ntx; en nuestro trabajo se observó lo contrario, que no se produce decremento a pesar de haber administrado dos dosis extremas y lo que va a determinar el efecto producido por la Ntx depende posiblemente de las diferentes estrategias de administración, ya que en el experimento 1 (Ntx1), experimento en el cual se produce una disociación entre la Ntx y el alcohol, se obtiene un efecto diferente al observado en los experimentos 2 (Ntx2) y 3 (Ntx3) donde se produce la asociación. Debido a que como se describe en la literatura que, el consumo de alcohol es dosis dependiente, esperábamos que a 10mg/kg se produjera dicho decremento. Por otro lado Williams y Woods (1999) encontraron que la Ntx únicamente decrementa la respuesta al etanol cuando éste es la solución preferida, disminuyendo la respuesta a una concentración de 2% la cual prefieren más que el agua, pero no se decrementa la respuesta a una solución de 32% de etanol la cual no era la solución preferida. Posiblemente en el presente estudio este pasando algo semejante, ya que a la concentración utilizada de alcohol (10%), el líquido preferido continuo siendo el agua.

Comparando el consumo de alcohol de los 3 grupos pudimos observar (Fig. 15) que en los periodos de postratamiento, el acceso al alcohol es significativamente mayor en el experimento 1 (Ntx1) con respecto a los otros dos experimentos (Ntx2 y Ntx3) y la dosis no tiene efecto ya que al experimento 2 (Ntx2) se le administró la misma dosis que a Ntx1, y los efectos son totalmente opuestos. Esto sugiere que la asociación del alcohol durante el tratamiento con Ntx juega un papel importante ya que al administrar el fármaco con acceso al alcohol se produce un menor efecto gratificante para el sujeto y no se incrementa su consumo una vez que la Ntx se ha interrumpido. De manera diferente, cuando el alcohol no estuvo asociado a los efectos de la Ntx, en el experimento 1, durante el post-tratamiento, donde posiblemente hay una mayor disponibilidad de receptores a opioides, un incremento en la liberación de opioides endógenos debido al consumo de alcohol y ausencia de bloqueo de los receptores por parte de la Ntx se produce, al parecer, un mayor efecto gratificante del alcohol, lo cual se refleja en el incremento en su consumo.

Se ha descrito que la Ntx puede tener un efecto indiscriminado sobre el consumo de líquidos (Goodwin et al, 2001; Gardell et al, 1996; Biggs & Myers, 1998). En el experimento 1 no se pudo evaluar el efecto sobre la preferencia de algún líquido ya que el alcohol no estuvo disponible durante el tratamiento con Ntx. En el experimento 2 no encontramos diferencias significativas con respecto al consumo de agua a diferencia de cuando se administró 10mg/kg Ntx en el que se puede observar una tendencia a decrementarse en los periodos de tratamiento con dicho fármaco observándose una recuperación en el consumo en los periodos de postratamiento significativamente mayor en el grupo Ntx, pero sin encontrarse ningún efecto en el consumo del alcohol. Al parecer en este efecto sí podría estar jugando un papel la dosis, ya que en el experimento 2 donde las condiciones fueron idénticas al experimento 3 excepto por la dosis, se observan diferentes efectos con la administración de la Ntx.

En nuestro caso, la dosis de Ntx de 10mg/kg produjo un incremento de alimento y la dosis de 2mg/kg no tuvo ningún efecto, esto posiblemente se debe a que como se mencionó previamente, esta dosis alta de Ntx redujo en forma significativa las propiedades reforzantes del alimento y los sujetos continuaban su ingesta, posiblemente con el fin de alcanzar los efectos gratificantes esperados, además no parece haber un efecto de compensación en los periodos posteriores a los de tratamiento, Jones y Corp (2003) encontraron que al administrar Ntx ($73\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{h}$) crónicamente a hamsters machos por medio de minibombas por un periodo de 6 días,

observaron un incremento en el consumo de alimento mientras que al administrarla agudamente (3mg/kg i.p.) 30 min antes de la exposición al alimento con 1 hr previa de privación, no encuentran diferencias entre grupos. Tratando de establecer una relación con los resultados de Jones y Corp (2003), podría ocurrir que la dosis crónica y sostenida produjera un efecto similar al planteado para la administración de 10mg/kg de nuestro estudio, en el sentido de una reducción de la gratificación esperada con el alimento y su consecuente conducta compensatoria. En el caso de la administración aguda de 3mg/kg posiblemente la combinación de una dosis baja con una insuficiente privación de alimento (1hora) no fue suficiente para observar resultados relevantes. Lo cual seguiría estando acorde con la conclusión de estos autores en el sentido de que, este efecto pudiese estar asociado a la afectación de diferentes componentes motivacionales relacionados con el sistema opioide.

Con base en los resultados del presente estudio podemos sugerir las siguientes conclusiones:

El experimento 1 apoya firmemente la sobre-regulación de receptores a opioides con el tratamiento de la Ntx, lo cual produce vulnerabilidad en el sujeto en el periodo inmediato posterior al tratamiento con este antagonista. Los resultados plantean una posible problemática que pudiera presentarse a nivel clínico, ya que nos muestra un incremento en el consumo de alcohol una vez suspendida la Ntx, por lo cual se sugiere un cuidado particular cuando se suspende el tratamiento con el antagonista al menos en la subsiguiente semana sin el fármaco.

En relación a la discrepancia en los resultados de los experimentos 2 y 3 con respecto a los descritos en la literatura donde el consumo del alcohol es asociado con los efectos del antagonista opioide, parece ser que el espacio temporal entre la administración del antagonista opioide y la exposición al alcohol en los modelos animales, pueden afectar los resultados ya que como se sabe el acceso al alcohol en la literatura es restringido a unas cuantas horas y en nuestro caso tenían acceso las 24hrs del día; considerando nuestra metodología es posible que a nivel clínico las terapias conductuales asociada a la terapia farmacológica puedan jugar un papel importante en los momentos en los cuales los efectos agudos de la Ntx han declinado.

Nuestros resultados también sugieren que los antagonistas opioides pueden tener efecto sobre otros estímulos con propiedades reforzantes distintos al alcohol. Durante el tratamiento con Ntx no se observó un efecto significativo sobre el consumo de alcohol (exp. 2 y 3), pero si sobre el alimento (exp. 3). Hay que tomar en cuenta que las ratas que utilizamos no pertenecían a cepas

con preferencia por el consumo de alcohol, por lo que la dosis pudiera tener efectos sobre aquellos estímulos que tiene un valor reforzante alto como es en este caso el alimento, ya que el alcohol no fue el líquido preferido en nuestras ratas.

REFERENCIAS

1. Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., & Waiker, J.M. (1984). Endogenous opioids: biology and function. *Annual Review of Neuroscience*, 7,223-255.
2. Bakshi, V.P., & Kelley, A.E. (1993). Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265,1253-126.
3. Biggs T.A., & Myers R.D. (1998). Naltrexone and amperozide modify chocolate and saccharin drinking in high alcohol-preferring P rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60,407-413.
4. Boyadjieva, N.I, Chaturvedi, K., Poplawski, M.M., & Sarkar, D.K. (2004). Opioid antagonist naltrexone disrupts feedback interaction between mu and delta opioid receptors in splenocytes to prevent alcohol inhibition of NK cell function. *Journal of Immunology*, 173,42-9.
5. Blum, K., & Payne, J.E. (1991). Alcohol and the Addictive Brain. EUA Free Press.
6. Brady, L.S. (2000). Opiate Receptor Regulation by Opiate Agonists and Antagonists. In: Hammer RP(Eds.), *The Neurobiology of opiates*. (pp. 125-143) Florida, CRC Press.
7. Ciccocioppo R., Martin-Fardon R., & Weiss F. (2002). Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. *Neuropsychopharmacology*, 27,391-9.
8. Coonfield, D.L., Hill, K.G., Kaczmarek, H.J., Ferraro III, F.M., & Kiefer, S.W. (2002). Low doses of naltrexone reduce palatability and consumption of ethanol in outbred rats. *Alcohol*, 26,43-47.

9. Cooper, S.J., & Kirkham, T.C. (1993). Opioid mechanisms in the control of food consumption and taste preferences. In: Herz A. (ed) *Handbook of Experimental Pharmacology: Opioids II* (pp 239-262), Springer-Verlag, Berlin.
10. Cowen, M.S., & Lawrence, A.J. (1999). The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 23(7),1171-212.
11. Charness, M. (1996). Ethanol regulation of the delta-opioid receptor gene. En el simposium: The neurobiology of ethanol-opioid interaction in ethanol reinforcement. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 8, 181A-186A.
12. de Waele, J.P., Kiiianmaa, K., & 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275,518-527.
13. de Waele, J.P., Papachristou, D., & Gianoulakis, C. (1992). The ethanol-preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hypothalamic beta-endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding DBA/2 mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261, 788-794.
14. Di Chiara, G.E., Acquas, E., & Tabas, G. (1996). Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: The dopamine-opioid link. Meeting report. *Alcohol*, 13, 13-17.
15. Fernández-Espejo, E. (2002). Bases neurológicas de la drogadicción. *Revista de Neurología*, 34(7), 659-664.
16. Foreman , J.C., & Johansen, T. (2003). Partial Agonist. In: Foreman , J.C. & Johansen, T (eds). *Textbook of receptor pharmacology* (pp 31) CRC Press.

17. Froehlich, J. (1996). Opioid peptides and alcohol drinking. En el simposium: The Neurobiology of ethanol-opioid interactions in ethanol reinforcement. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 20, 181A-186A.
18. Gardell, L. R., Hubbell, C. L., & Reid, L. D (1996). Naltrexone persistently reduces rats' intake of a palatable alcoholic beverage. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 20, 584-588.
19. Genazzani, A.R., Nappi, G., Facchinetti, F., Mazzella, G.L., Parrini, D., & Sinforiani, E. (1982). Central deficiency of beta-endorphin in alcohol addicts. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55, 583-586.
20. Gianoulakis, C. (1990). Characterization of the effect of acute ethanol administration on the release of β -endorphin peptides by the rat hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, 180, 21-29.
21. Gianoulakis, C. (2001). Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 26(4), 304-318.
22. Gianoulakis, C., & Barcomb A. (1987). Effect of acute ethanol in vivo and in vitro on the β -endorphin system in the rat. *Life Sciences*, 40, 19-28.
23. Gianoulakis, C., Krishnan, B., & Thavundayil, J. (1996). Enhanced Sensitivity of pituitary β -endorphine to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Archives of General Psychiatry*, 53, 250-257.
24. Gonzalez, R.A., & Weiss, F. (1998). Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamina levels in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 18, 10663-10671.

25. González J.P., & Brogden, R.N. (1988). Naltrexone: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs*, 35, 192-213.
26. Goodwin, F.L., Campisi, M., Babinska, I., & Amit, Z. (2001). Effects of naltrexone on the intake of ethanol and flavored solutions in rats, *Alcohol*, 25, 9-19.
27. Guzman, A., Legendre, P., Allard, M., Geoffre, S., Vincent, J.D., & Simonnet, G. (1989). Electrophysiological effects of FLFQPQRF amide, an endogenous brain morphine modulating peptide, on cultured mouse spinalcord neurons. *Neuropeptides*, 14, 159 – 165.
28. Hallmark R.A., & Hunt P.S. (2004). Social learning about ethanol in preweanling rats: role of endogenous opioids. *Developmental Psychobiology*, 44, 132-139.
29. Hamilton, M.G., & Hirst, H. (1980). Alcohol-related tetrahydroisoquinolines: pharmacology and identification. *Substances and Alcohol Actions Misuse*, 1(2), 121-144.
30. Herz, A., (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129, 99-111.
31. Hill, K.G., & Kiefer, W. (1997). Naltrexone treatment increase the aversiveness of alcohol for outbred rats. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 21, 637-642.
32. Ikemoto, S., McBride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L., & Li, T-K. (1997). 6- OHDA- lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not maintenance of ethanol consumption in the alcohol preferring P line of rats. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 21, 1042-1046.
33. Inoue, H., (2000). Effects of naltrexone on the accumulation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan and on the firing rate induced by acute ethanol administration. *European Journal of Pharmacology*, 406, 375-380.

34. Jamensky, N.T., & Gianoulakis, C. (1997). Content of dynorphins and Kappa-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 21, 1455-1464.
35. Jalowiec J.E., Panksepp, J., Zolovick, A.J., Najam, N., & Herman B.H. (1981). Opioid modulation of ingestive behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15, 477-484.
36. Jarros, P.A., & Metzger, B.L. (2002). The effect of opioid antagonism on food intake behavior and body weight in biobehavioral model of obese binge eating. *Biological Research of Nursing*, 3(4), 198-209.
37. Jones, J.E., & Corp, E.S. (2003). Effects of naltrexone in food intake and body weight in Syrian Hamsters depends on metabolic status. *Physiology and Behavior*, 78, 67-72.
38. Jones, J.E, Corp, E.S., & Wade G.N. (2001). Effects of naltrexone and CCK on estrous behavior and food intake in Syrian hamsters. *Peptides*, 22, 601-606.
39. Juárez, J., & Barrios De Tomasi, E. (1999). Sex differences in alcohol drinking patterns during forced and voluntary consumption in rats. *Alcohol*. 19, 15-22.
40. Kalant, H., (1996). Pharmacokinetics of ethanol: Absorption, Distribution and Elimination. In: Begleiter, H., & Kissin B. (eds) *The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence* (pp15-58) NY, Oxford University Press.
41. Kelley, A.E., Bless, E.P., & Swanson C.J. (1996). Investigation of the effects of opiate antagonists infused into the nucleus accumbens on feeding and sucrose drinking in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278, 1499-1507.

42. Kiefer, F., Horntrich, M., Jahn, H., & Wiedemann, K. (2002). Is withdrawal-induced anxiety in alcoholism based on β -endorphine deficiency. *Psychopharmacology*, 162, 433-437.
43. Koob, G.F., & LeMoal, M. (1997). Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278, 52-58.
44. Kosterlitz, H., & Paterson, S. (1980), Characterization of opioid receptors in nervous tissue. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 27, 113-122.
45. Leslie, F.M. & Loughlin, S.E. (2000) Ontogeny and plasticity of opioid system. In: Hammer RP, ed. *The Neurobiology of opiates*. (pp125-143) Florida, CRC Press.
46. Levenson, R.W., Sher, K.J., Grossman, L.M., Newman, J., & Newlin, D.B. (1980). Alcohol and stress response dampening: Pharmacological effects, expectancy and tension reduction *Journal of Abnormal Psychology*, 89, 528-538.
47. Levitan, I.B., & Kaczmarck, L.K. (2002). Receptors and transduction mechanisms II: Indirectly coupled receptor/ion channel system. In: Levitan, I.B. & Kaczmarck, L.K. (eds). *The neuron cell and molecular biology* (pp 305) Oxford University Press.
48. Lowy, M.T., & Yim, G.H. (1982). Drinking, but not feeding, is opiate sensitive in hamsters. *Life Sciences*, 30, 1639-1644.
49. Marin-Bivens, C.L., & Olster, D.H. (1999). Opioid receptor blockade promotes weight loss and improves the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63(3), 515-520.
50. Marks-Kaufman, R., Balmagiya, T., & Gross, E. (1984). Modification in food intake and energy metabolism in rats as a function of chronic naltrexone infusions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 20, 911-916.

51. Matsuguchi, N, Yoshishige, I, Shirao, I, & Tsujimaru S. (1994) Blocking effects of ethanol on stress-induced activation of rat mesoprefrontal dopamine neurons. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48, 297-299.
52. Mendez, M., & Cruz, C. (1999). Brain reinforcement mechanisms of alcohol. II Neurochemical basis: Role of opioid system. *Salud Mental*, 22, 52-59.
53. Nash, J.M. (1997). Addicted. *Time*, 149, 69-79.
54. O'Malley, S. (1998). Naltrexone and alcoholism treatment. US Department of Health and Human Services.
55. Oswald, L.M., & Wand, G.S. (2004). Opioids and alcoholism. *Physiology and Behavior*, 81, 339-358.
56. Parkes, H., & Sinclair, J.D. (2000). Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol*, 21, 215-221.
57. Phillips TJ, Wenger ChD, & Dorow JD. (1997). Naltrexone effects on ethanol drinking acquisition and on established ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 21, 691-702.
58. Philpot, R.M., & Kirstein, C.L. (1998). The effects of repeated alcohol exposure on the neurochemistry of the periadolescent nucleus accumbens septi. *Neuroreport*, 9(7), 1359-1363.
59. Rasmussen, D.D., Bryant, C.A., Boldt, B.M., Colasurdo, E.A., Levin, N., & Wilkinson C.W. (1998). Acute alcohol effects on opioimelanocortinerbic regulation. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 22, 789-801.

60. Reid, L. D., Gardell, L.R., Chattopadhyay, S., & Hubell, C.L. (1996). Periodic naltrexone and propensity to take alcoholic beverage. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 20, 1329-1334.
61. Schuckit, M.A. (2000). Drug and alcohol abuse. NY Kluwer Academic/Plenum Publishers; 317.
62. Shaw, J., Miller, L., Turnbull, M., Gormley, J., & Morley, J. (1982). Selective antagonists at the opiate delta receptor. *Life Sciences*, 31, 1259-1262.
63. Sinclair, J. D., (1989). Method for Treating Alcohol-Drinking Response. USA Patent 4,882,335.
64. Sinclair J.D., (1990). Drugs to decrease alcohol drinking. *Annals of Medicine*, 22, 357-362.
65. Sinclair, J.D. (1996). Effects of opiate antagonists on alcohol intake in animal model . En la mesa redonda: Alternatives to naltrexone in animal models. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 20, 231A-235A.
66. Sinclair, J.D. (2001). Evidence about the use of naltrexone and for different ways of using it in the treatment of alcoholism. *Alcohol Alcoholism*, 36, 2-10.
67. Spanagel, R., & Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends of Neuroscience*, 22, 521-527.
68. Stromberg, M.F., Volpicelli, J.R., & O'Brien, C.P. (1998). Effects of naltrexone administered repeatedly across 30 or 60 days on ethanol consumption using a limited access procedure in the rat. *Alcohol Clinical and Experimental Research*, 22, 2186-2191.

69. Strother, W.N., Chernet, E.J., Lumeng, L., Li, T.K., & 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, 31-38.
70. Tempel, A., Gardner, E., & Zukin, R. (1984). Visualization of opiate receptor upregulation by light microscopy autoradiography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 3893-3897.
71. Terenius, L. (1996). Alcohol addiction (alcoholism) and the opioid system. *Alcohol*, 13(1), 31-34. Review.
72. Thiagarajan, A.B., Mefford, I.N., & Eskay, R.L. (1989). Single-dose ethanol administration activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis; exploration of the mechanism of action. *Neuroendocrinology*, 50, 427-432.
73. Tomkins, D.M., & Sellers, E.M. (2001). Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *Canadian Medical Association Journal*, 164, 817-821.
74. Turchan, J., Przewlocka, B., Toth, G., Lason, W., Borsodi, A., & Przewlocki, R. (1999). The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience*, 91, 971-977.
75. Ulm, R.R., Volpicelli, J.R., & Volpicelli, L.A. (1995). Opiates and alcohol self-administration in animals. *Journal of Clinical Psychiatry*, 56(Suppl. 7), 5-14.
76. Volpicelli, J.R., Clay, K.L., Watson, N.T., & O'Brien, C.P. (1995). Naltrexone in the treatment of alcoholism: predicting response to naltrexone. *Journal of Clinical Psychiatry*, 56, 39-44.

77. Wand, G. (1996). Mechanisms controlling opioid prohormone gene expression. En el simposium de the neurobiology of ethanol-opioid interactions in ethanol reinforcement. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 8, 181A-186A.
78. Weiss, F., & Porrino, L. (2002). Behavioral Neurobiology of alcohol addiction: Recent Advances and Challenges. *Journal of Neuroscience*, 22, 3332-3337.
79. Weiss, F., Lorang, M.T., Bloom, F.E., & Koob, G.F. (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(1), 250-258.
80. Wiberg, G.S., Samson, J., Maxwell, W.B., Coldwell, B.B., & Trenholm, H.I. (1971). Further studies on the acute toxicity of ethanol in young and old rats: Relative importance of pulmonary excretion and total body water. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 20, 22-29.
81. Williams, K.L., & Woods, J.H. (1999). Naltrexone reduces ethanol and/or water-reinforced responding in rhesus monkeys: effect depends upon ethanol concentration. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23, 1462-1467.
82. Williams, K.L., & Woods, J.H. (1998). Oral ethanol-reinforced responding in rhesus monkeys: effects of opioid antagonists selective for μ , κ or δ -receptor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 1634-1639.
83. Wise, R.A. (1984). Neural mechanisms of the reinforcing action of cocaine. *NIDA Research Monograph*, 50, 15-33.
84. Yeomans, M.R., & Gray, R.W. (1997). Effects of naltrexone on food intake and changes in subjective appetite during eating: evidence for opioid involvement in the appetizer effect. *Physiology and Behavior*, 62(1), 15-21.

85. Yeomans, M.R., & Gray, R.W. (2002). Opioid peptides and the control of human ingestive behavior. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 26(6), 713-728.
86. Yoburn, B., Nunes, F., Adler, B., Pasternak, G., & Inturrisi, C. (1986). Pharmacodynamic supersensitivity and opioid receptor upregulation in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 239, 132-135.
87. Yoburn, B.C., Sierra, V., & Lufty, K. (1989). Chronic opioid antagonist treatment: assessment of receptor upregulation. *European Journal of Pharmacology*, 170(3), 193-200.