




**Área de Fisiología
Departamento de Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universidad de Jaén**

**EFFECTO DEL ALCOHOL ETÍLICO SOBRE LA ACTIVIDAD
ESPECÍFICA DE AMINOPEPTIDASAS REGULADORAS DE
NEUROPEPTIDOS EN NEURONAS Y ASTROGLÍA EN CULTIVO.**

**Guadalupe Medina Caballero
Trabajo de Investigación Tutelado
Jaén, 2006**



Esta Memoria de Investigación Tutelada ha sido realizada en el Área de Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, dentro del Grupo de Investigación de la Junta de Andalucía denominado “Fisiología y Patología Experimental y Clínica” (código CVI 296), y bajo la dirección de los Dres. María Jesús Ramírez Expósito y José Manuel Martínez Martos.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la subvención del Instituto de Salud Carlos III, a través del Proyecto FIS PIO 030922, y las Ayudas a los Grupos de Investigación de la Junta de Andalucía.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Alcohol Etílico.

El alcohol es la sustancia psicoactiva más utilizada en el mundo después de la cafeína. Su acción afecta virtualmente a todos los órganos del cuerpo, pero su principal efecto se ejerce sobre el SNC (Freund, 1973; Seixas y Eggleston, 1973; 1976; Deitrich *et al.*, 1989; Nutt y Glue, 1990; Little, 1991; Samson y Harris, 1992; Littleton y Little, 1994; Nevo y Hamon, 1995; Tsai *et al.*, 1995; Tabakoff y Hoffman, 1996; Tabakoff *et al.*, 1996; Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). También se tiene el concepto de que el alcohol es un veneno citoplasmático que causa la muerte de un cierto número de células (neuronas) en cada exposición (Edmondson *et al.*, 1956), ya que tiene la propiedad de ser deshidratante y precipitar las proteínas del citoplasma, siendo capaz de lesionar las células con las que se pone en contacto (Gaddum, 1959).

La ingesta moderada no acarrea riesgos directos para los diferentes sistemas fisiológicos, pero su consumo excesivo o crónico a largo plazo se asocia a numerosos procesos degenerativos e inflamatorios del SNC, además del resto de tejidos como hígado, corazón, músculo esquelético, páncreas o tracto gastrointestinal (Fadda y Rossetti, 1998). El daño en el SNC, que puede ser atribuible a la intoxicación aguda, estaría limitado a los desórdenes funcionales tales como el envenenamiento de alcohol, el daño cerebral, las interacciones droga-alcohol y la disminución del umbral de ataque en una resaca o retirada (Mucha y Pinel, 1979). Estos efectos agudos son generalmente reversibles, si bien los casos de envenenamiento se deben a la depresión funcional de los centros respiratorios.

El alcohol que aparece en mayor proporción en las bebidas alcohólicas es el etanol, aunque estas también contienen pequeñas cantidades de otros alcoholes. El etanol o alcohol etílico (C_2H_5OH), en términos farmacológicos, pertenece al grupo de los alcoholes alifáticos de cadena abierta, siendo este el más importante (Grollman y Grollman, 1970; Crossland, 1980). Aunque actualmente es poco utilizado como medicamento (Laurence y Bennett, 1980; Meyers *et al.*, 1981), es de gran importancia por servir de introducción para la farmacología de los anestésicos generales y los hipnóticos, con los que se relaciona íntimamente (Clark, 1942).

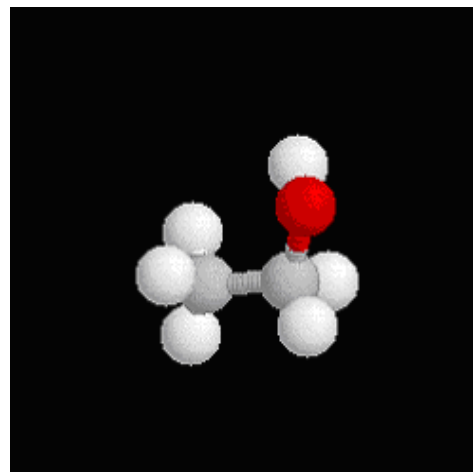


Figura 1. Representación de la estructura de la molécula de etanol.

1.2. Mecanismos de Acción del Etanol.

La complejidad y multitud de los efectos que produce en los sistemas neuronales el etanol depende de la simplicidad de su estructura química. El etanol es una droga débil, cuya molécula no contiene ningún carbono asimétrico. Así, su interacción con sustratos biológicos no es estereo-selectiva (*figura 1.*).

El grupo hidroxilo (OH) favorece la formación de puentes de hidrógeno con aceptores o dadores de electrones de proteínas o cabezas polares de las membranas fosfolípídicas (Franks y Lieb, 1978; Brockerhoff *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990; Abaham *et al.*, 1991; Barry y Gawrish, 1994). Esta formación de puentes de hidrógeno hace al etanol soluble en agua y mediante estos puentes de hidrógeno puede modificar la organización de las moléculas de agua en la matriz extracelular (Yurttas *et al.*, 1992) alterando también la solvencia de los ligandos o de los iones que interaccionan con las proteínas receptoras. Este mecanismo de solvencia puede contribuir a la peculiar susceptibilidad que tienen los canales dependientes de ligando de los transmisores y los canales iónicos al etanol (Fadda y Rossetti, 1998).

Además, el otro extremo final de la molécula del etanol contiene un grupo lipofílico que puede interaccionar con dominios no polares. Por tanto, y al contrario de lo que se cree, el etanol tiene baja solubilidad en lípidos. Se localiza en la región de las cabezas polares y muy poco entre los lípidos de membranas neuronales (Barry y Gawrish, 1994). Estas propiedades físico-químicas favorecen las fuerzas de interacción del etanol con sustratos biológicos. Aunque el etanol puede afectar al balance térmico natural que mantiene la arquitectura de las membranas y puede alterar los dominios que determinan las interacciones proteína-membrana y proteína-ligando (Wang *et al.*, 1993), también se ha visto que puede actuar directamente en las proteínas de las membranas produciendo cambios conformacionales que alteren su función (Eyring *et al.*, 1973; Franks y Lieb, 1982; 1991; 1994; Lovinger *et al.*, 1989; Dickinson *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Peoples y Weight, 1995; Lovinger, 1997). Dicho efecto limitante no se debe a la interacción del alcohol con la membrana lipídica, sino que implica la interacción del alcohol con un bolsillo conformacional, teniendo una arquitectura esférica relativamente rígida en la estructura de la proteína receptora (Peoples y Weight, 1995).

La genética molecular muestra evidencias de la interacción del etanol con sitios específicos localizados en proteínas de membrana. Por mutagénesis dirigida se han identificado dos sitios inhibitorios, en el receptor muscular de la acetilcolina (ACh) (Forman *et al.*, 1995) y en el dominio N-terminal extracelular de un receptor neuronal de la "7-ACh (Yu *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Además, el etanol ha mostrado interacción con un sitio en los dominios transmembrana del receptor

quimera de la serotonina (5-hidroxitriptamina; 5HT), 5HT₃ (Zhang *et al.*, 1997). En construcciones de receptores quiméricos (Mihic *et al.*, 1997) se ha identificado una región de 45 residuos aminoacídicos en los dominios transmembrana 1 y 3 del receptor ácido-(-N-butírico A (GABA_A) y del receptor de la Gly que ponen en duda la modulación alostérica de este receptor por etanol. Otros estudios en oocitos de *Xenopus* muestran la interacción directa que existe entre etanol y proteínas, también por el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wright *et al.*, 1996). En este receptor el etanol interacciona con un sitio alostérico que es independiente del sitio de reconocimiento por el agonista Glu o Gly y reduce la eficacia de los agonistas por modulación de las cinéticas de la entrada de los canales (Fadda y Rossetti, 1998).

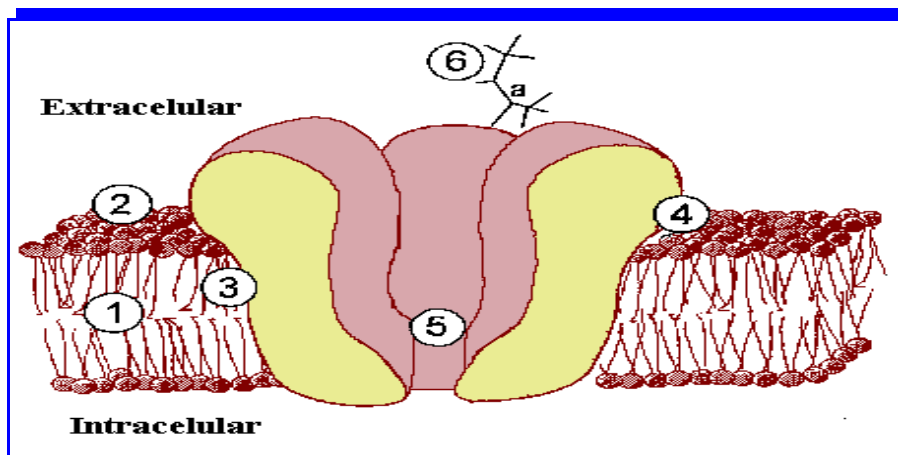


Figura 2. Esquema de los dominios celulares con los que el etanol puede interaccionar en un hipotético receptor acoplado a un canal iónico. El etanol puede producir cambios en la arquitectura de la membrana alterando el orden o composición de los lípidos de membrana (1) o modificando la estructura fosfolipídica entre los microdominios proteína-lípidos (3). El etanol interacciona primeramente con la cabeza polar de fosfolípidos (2) en la interfase/dominio lípidos-agua formando puentes de hidrógeno. Estas interacciones producen pequeños efectos en la función de las proteínas de membrana y solamente con altas concentraciones de etanol (>100 mM). Interacciones específicas-directas con la estructura aminoacídica de la proteína se dan a concentraciones farmacológicamente relevantes (10-50 mM) entre los bolsillos hidrofóbicos de los dominios agua-proteína. Estos sitios pueden cerrarse en la interfase agua-lípidos (4) como en los receptores GABA_A y de Gly, o pueden estar asociados al mecanismo de entrada del canal (5), como el receptor NMDA o en los sitios alostéricos en el dominio extracelular N-terminal (a) que tiene el sitio de reconocimiento para el ligando endógeno (6) como es el caso del receptor de la ACh.

Resumiendo, los efectos farmacológicos del etanol no son selectivos en tanto que pueden afectar a la organización de la membrana, la función de los enzimas que están unidos a la membrana, los canales iónicos, los enzimas y las proteínas implicadas en la señal de trasducción y expresión de genes, las proteínas transportadoras y los ionóforos acoplados a receptores (Tabakoff y Hoffman, 1996a;

Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). Por el contrario sus efectos son específicos en tanto que el etanol interacciona con sitios discretos en cada proteína particular que ponen en duda la función proteica y el funcionamiento celular. A continuación se muestran esquemáticamente los dominios celulares con los que el etanol puede interaccionar en un receptor hipotético (Fadda y Rossetti, 1998) (*figura 2*).

1.3. Alcohol Etílico y Sistema Nervioso Central.

El mecanismo de acción del etanol implica muchos sitios en el SNC, por medio de su influencia en la función de la mayoría de los sistemas neuronales a nivel molecular, celular o de sistemas. Esto queda evidenciado por la reversibilidad de la interacción del etanol con sustratos neurobiológicos, las alteraciones en las funciones cerebrales asociadas a la ingesta crónica de etanol son el resultado de modificaciones adaptativas (plásticas) que tienen lugar en el cerebro en respuesta a los efectos del etanol. Estos cambios pueden ser de corta duración o duraderos pero reversibles, o pueden ser permanentes y estar asociados a procesos degenerativos en algunas estructuras cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Hay que tener cuidado al extrapolar datos de roedores a humanos porque los animales muestran mayor resistencia a los efectos del etanol (Litter, 1988). Por lo general, en animales de experimentación la administración de alcohol produce un estado depresivo evidenciado por sueño, con pérdida de los reflejos de la postura y que a altas dosis lleva a la muerte por parada respiratoria (Frommel y Seydoux, 1964).

La acción farmacológica fundamental del alcohol se ejerce sobre el SNC (Gaddum, 1959; Laurence y Bennett, 1980) y es depresora general de acción inespecífica o no selectiva (Ley de Jackson), disminuyendo la función de todos los centros nerviosos en sucesión ordenada (Grollman y grollman, 1970; Bowman y Rand, 1980; Crossland, 1980; Laurence y Bennett, 1980; Clark, 1981; Meyers *et al.*, 1981; Bradley *et al.*, 1986; Carlsson, 1987; Ashton, 1993), cuyas manifestaciones están relacionadas con la concentración sanguínea de la droga (Gaddum, 1959; Bradley *et al.*, 1986; Carlsson, 1987; Litter, 1988; Ashton, 1993). Podría hablarse de cuatro periodos en los que queda claro el conocido perfil bifásico del etanol (Pohorecky, 1977; Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994).

1. En una situación normal (Periodo O), los centros corticales superiores, con su influencia inhibitoria sobre los centros cerebrales inferiores, permiten un

comportamiento sano, sin dar libertad a los instintos primitivos liberados bajo la influencia del alcohol (Bowman y Rand, 1980).

2. Periodo I: En situaciones iniciales de ingesta o de baja concentración de alcohol (Gaddum, 1959; Bowman y Rand, 1980; Meyers, *et al.*, 1981) se produce un incremento de la actividad del individuo debido a la liberación de los centros cerebrales inferiores por depresión de los centros corticales superiores, que normalmente ejercen una influencia inhibitoria sobre los primeros (Gaddum, 1959; Clark, 1942; Crossland, 1980; Laurence y Bennett, 1980; Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994). Y esto se manifiesta en una estimulación motora o funcional donde se produce una disminución del tiempo de reacción, del juicio y precisión del funcionamiento del individuo (memoria, atención) (Mechoulam, 1986; Pratt, 1991; Kalivas y Samson, 1992; Smith, 1994). El alcohol tiene la propiedad de atenuar la ansiedad, con acción sedante, semejante a los hipnóticos y sedantes (Meyers *et al.*, 1981). Es frecuente la producción de sueño, lo que indica que se ha actuado sobre la formación reticular del tallo cerebral (Laurence y Bennett, 1980).
3. Periodo II: Se afectan los centros subcorticales del tallo cerebral, incluyendo los vestibulares, y cerebelo (Grollman y Grollman, 1970). Las alteraciones funcionales son evidentes (Clark, 1942), se pierde la coordinación, existe confusión, ataxia. Existe pérdida absoluta del autocontrol por falta de la inhibición (Crossland, 1980).
4. Periodo III: Se afectan los centros espinales (Bowman y Rand, 1980), provocando sueño profundo, inconsciencia, estupor, llegando al coma, semejante a la anestesia general (Crossland, 1980).
5. Periodo IV: Se deprimen los centros bulbares (vasomotor, respiratorio) existiendo peligro de muerte (Meyers *et al.*, 1981); el coma es profundo, la piel está húmeda y fría, el pulso acelerado y las respiraciones lentas (Bowman y Rand, 1980).

Estos periodos corresponden aproximadamente a los que producen los anestésicos generales (Meyers *et al.*, 1981), pero se diferencian de ellos en que el segundo periodo es mucho mas largo para el alcohol (Litter, 1988).

Todo esto demuestra que el alcohol es un depresor, especialmente de los centros corticales inhibidores superiores (Clark, 1942; Laurence y Bennett, 1980) y

al respecto debe señalarse que los reflejos condicionados inhibidores son deprimidos por el alcohol más fácilmente que los reflejos positivos (Gaddum, 1959).

Por otro lado, el desorden más relacionado al alcoholismo se da por la desmielinización de los nervios periféricos, lo que se llama neuropatía periférica. El alcohol en contacto con el nervio, bloquea los impulsos sensitivos y motores provocando anestesia y parálisis (Bowman y Rand, 1980). Esta se asocia a la disminución de la agudeza sensorial, parestesia y disminución de la velocidad de conducción (Fadda y Rossetti, 1998). La desmielinización refleja la deficiencia en tiamina (vitamina B₁₂) (Victor *et al.*, 1989), y esta carencia de tiamina daña al SNC (Kril, 1996; Longlais *et al.*, 1996) causando un desorden neurológico, por la combinación de diversos factores como son: la malnutrición o una dieta inadecuada (falta de vitaminas), la reducción de la absorción gastrointestinal y la disminución del almacenamiento hepático de esta vitamina y el uso dañino del alcohol (Thomson *et al.*, 1983). Consecuencia de esto, en el cerebro de alcohólicos han sido observadas una gran variedad de cambios neuropatológicos y morfológicos denominado encefalopatía de Wernicke. Y aunque es posible caracterizar cambios patológicos en diferentes regiones cerebrales no está claro como es que la deficiencia en tiamina causa lesiones cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Solamente los alcohólicos deficientes en tiamina desarrollan la encefalopatía de Wernicke, quizás porque han heredado (Blass y Gibson, 1977; Mukherjee *et al.*, 1987) o adquirido (Jeyasingham *et al.*, 1987) anomalías del enzima dependiente de tiamina, transcetolasa, que va a reducir su afinidad por la tiamina (Charness, 1996). La tiamina es un cofactor de la transcetolasa, la α -cetoglutarato-dehidrogenasa y de la piruvato deshidrogenasa (Victor *et al.*, 1989) y puede funcionar en la conducción axonal y transmisión sináptica (Iwata, 1982). Estas enzimas dependientes de tiamina juegan un papel importante en el uso de la energía cerebral. Se propuso que la deficiencia en tiamina inicia el daño neuronal mediante la inhibición del metabolismo energético en regiones cerebrales con requerimientos metabólicos altos (Butterworth *et al.*, 1993). Además se demostró que la carencia de tiamina causa disminución en el uso de la glucosa cerebral (Hakim, 1984; Hakim y Pappius, 1983).

Estudios en animales superiores sugieren que la excitotoxicidad puede ser parte del camino final que va de la deficiencia en tiamina al daño neuronal. Las lesiones de Wernicke pueden prevenirse quitando el Glu que se acumula en determinadas regiones cerebrales (Langlais y Zhang, 1993). El hecho de que el tratamiento crónico con etanol aumente la densidad de los receptores NMDA en determinadas regiones cerebrales (Grant *et al.*, 1990b; Gulya *et al.*, 1991) sugiere

la existencia de un posible mecanismo por el que la ingestión crónica de etanol puede potenciar la excitotoxicidad del Glu en la encefalopatía de Wernicke (Lovinger, 1993).

Pero, el 80% de los pacientes alcohólicos que se recuperan de la encefalopatía de Wernicke muestran el daño selectivo de la memoria denominado síndrome amnésico de Korsakoff (Victor *et al.*, 1989). En general, aparece un estado de confusión mental donde las funciones cognitivas como la inteligencia y la memoria están dañadas, junto con debilidad emocional, ataxia y/o parálisis de los músculos externos del ojo (Bowden, 1990; Jacobson *et al.*, 1990).

Este síndrome de Korsakoff no es una secuela frecuente de la encefalopatía de Wernicke en individuos no alcohólicos (Freund, 1973), y aunque es posible que los efectos neurotóxicos del etanol empeoren el desorden cerebral de la deficiencia en tiamina, está claro que el síndrome de Korsakoff puede darse en ausencia de la ingesta de etanol (libro del alcohol). Cuando se dan ambos casos se habla del síndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) (Victor y Yakoulav, 1955; Korsakoff, 1889; 1890).

Cuando durante la vida de un individuo se ha ingerido bastante alcohol se predicen peores consecuencias en el rendimiento neuropsicológico (Eckardt *et al.*, 1995). En la permanencia de la abstinencia se pueden resolver alguno de los déficits observados (Bennett, 1960; Volkow *et al.*, 1994).

Estudios neuropatológicos han mostrado la reducción de peso y volumen que muestra el cerebro en alcohólicos (Bergman *et al.*, 1980; Carlen *et al.*, 1981; Harper y Blumbergs 1982; Wilkinson 1982; Ron 1983; Harper y Kril 1985; Torvik 1987a,b; Lindboe y Loberg 1988). Se ha mostrado una correlación negativa entre la cantidad de alcohol consumido durante toda la vida y el grado de atrofia cerebral (pérdida de materia blanca) (Harding *et al.*, 1996; Krill *et al.*, 1997). La reducción del peso del cerebro y volumen se justifica por una reducción en el volumen de la materia blanca de los hemisferios cerebrales mas que por una pérdida de tejido cortical (Harper *et al.*, 1985; De la Monte, 1988; Pfefferbaum *et al.*, 1992), que es proporcional al aumento del espacio entre cerebro y cráneo, el volumen ventricular (De la Monte, 1988). Existe un componente de la pérdida que es reversible en periodos de abstinencia (Carlen y Wilkinson, 1987; Shear *et al.*, 1994; Pfefferbaum *et al.*, 1995; Trabert *et al.*, 1995). Otros estudios han demostrado también una disminución del volumen de la materia gris (Pfefferbaum *et al.*, 1992; Shear *et al.*, 1994). Muchos de los cambios producidos en la materia blanca parecen estar relacionados con cambios en la mielinización. Aquellos que tienen complicaciones adicionales como

cirrosis o el SWK tienen las mayores reducciones de peso del cerebro (Harper y Blumbergs, 1982; Vitor *et al.*, 1989).

Como ya se ha visto existen pocas dudas de que el etanol, en un periodo de tiempo considerable, puede originar daños en diferentes estructuras que se asocian a un amplio rango y variabilidad de daños neuroanatómicos. A continuación se muestran algunas de las estructuras que sufren una mayor reducción debido a que contienen gran cantidad de materia blanca (Nasrallah *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1987; Harper y Krill, 1988; Pfefferbaum *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1996) (figura 3):

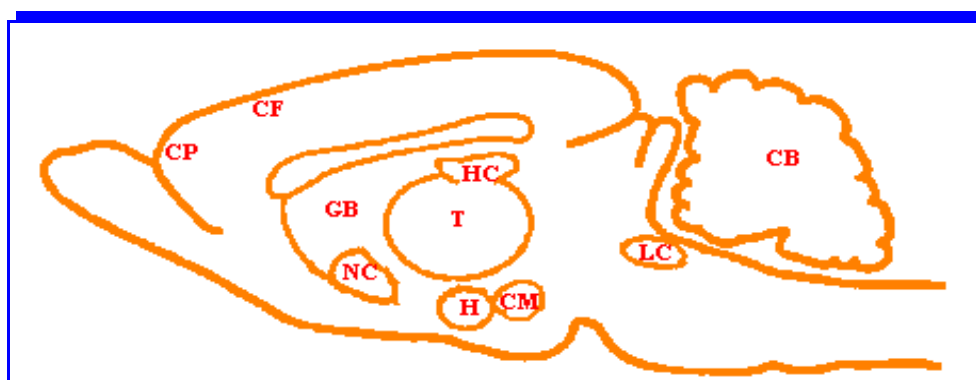


Figura 3. Esquema de las diferentes zonas en las que el etanol puede actuar produciendo una reducción de materia blanca; Cerebelo (CB); Cerebro basal: núcleos colinérgicos (NC); Diencefalo: cuerpos mamilares (CM), hipotálamo (HT), tálamo (T); Ganglios basales (GB); Lóbulos frontales: corteza frontal (CF), corteza prefrontal (CP); Lóbulo temporal: hipocampo (HC); Locus ceruleus (LC).

*Lóbulos frontales. La región que parece estar más afectada que otras regiones corticales (Walsh, 1985; Mayes *et al.*, 1988; Shimamura *et al.*, 1988; Kril y Harper, 1989; Jacobson y Lishman, 1990; Jernigan *et al.*, 1991a,b) donde existe un metabolismo menor respecto a individuos que no toman alcohol (Samson *et al.*, 1986; Hata *et al.*, 1987; Sachs *et al.*, 1987; Wik *et al.*, 1988; Gilman *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1993). Y es que debido a que el etanol disminuye el flujo sanguíneo en el lóbulo medio frontal (Adams *et al.*, 1993), esta zona y regiones periventriculares también muestran menor flujo sanguíneo cerebral (Hunter *et al.*, 1989; Melgard *et al.*, 1990), produciéndose una reducción del metabolismo de la glucosa, además de daños en la función de la memoria, ya que las zonas implicadas en esta son la corteza frontal, ventromedial y las conexiones que existen entre estas. Esta región a su vez está conectada con estructuras del sistema límbico y del diencefalo (Samson *et al.*, 1986; Gilman *et al.*, 1990). Debido al papel que tiene la corteza prefrontal en la motivación y percepción, es posible que las carencias cognitivas asociadas al daño del lóbulo frontal se deban a una disfunción en

la neurotransmisión dopaminérgica mesocortical en individuos que toman etanol, ya que la corteza prefrontal está íntimamente ligada a la zona basal del cerebro, a las estructuras del lóbulo medial y al diencefalo (Fadda y Rossetti, 1998).

- *Diencefalo. El diencefalo, incluye dos regiones principales, tálamo e hipotálamo. Estas estructuras, que están implicadas en la memoria, también parecen ser vulnerables en alcohólicos. Los cuerpos mamilares del hipotálamo, el núcleo talámico medio dorsal (MD) y las fibras nerviosas que conectan estas dos estructuras son las principales zonas dañadas (Victor *et al.*, 1971; Alling y Bostrom, 1980; Markowitsch, 1988; 1989; Squire *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1995), junto a un ensanchamiento del tercer ventrículo (Shimamura *et al.*, 1988; Jacobson y Lishman, 1990; Jernigan *et al.*, 1991a). Existen en la literatura bastantes patologías talámicas e hipotalámicas en alcohólicos, pero la mayoría relacionadas con pacientes con deficiencia en tiamina (SWK) (Harper, 1983; Victor *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1996; Harper y Butterworth, 1997). Existe relación entre el volumen del tálamo y la máxima cantidad de alcohol tomada al día (Krill *et al.*, 1997). Aunque no se dan anomalías microscópicas y macroscópicas específicas (Harper, 1998).
- *Cerebro basal. Comprende los núcleos colinérgicos tales como el núcleo septal medial, núcleo de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. Arendt y colaboradores (1983) encontraron pérdidas significativas de neuronas en el núcleo basal de Meynert en pacientes Korsakoff, y otros autores han confirmado la muerte celular producida en neuronas colinérgicas del cerebro basal (Halliday *et al.*, 1994; Cullen y Halliday, 1995).
- * Lóbulo medio temporal. Aquí se encuentra una mayor reducción de volumen (Jernigan *et al.*, 1991a,b). El déficit de volumen del hipocampo no es la causa de los daños en la memoria o de la amnesia, aunque puede contribuir al daño de la memoria cuando se combina con déficit de volumen en otras áreas cerebrales implicadas en la memoria como son el núcleo talámico y los cuerpos mamilares (Sullivan *et al.*, 1995). Aunque hay autores que han demostrado como el daño en el hipocampo por si solo es suficiente para producir una pérdida significativa (Press *et al.*, 1989). Se ha visto que hay neuronas en el hipocampo que son dañadas por el alcohol selectivamente (Walker *et al.*, 1980b; McMullen *et al.*, 1984), y también se ha visto que el cambio producido se explica por la pérdida de materia blanca (Fadda y Rossetti, 1998).

- *Cerebelo. Se produce hipometabolismo y atrofia del cerebelo (Cala *et al.*, 1978; Gilman *et al.*, 1990; Davila *et al.*, 1994) que se asocia frecuentemente al alcoholismo (Victor *et al.*, 1971; Torvik *et al.*, 1982; Harper, 1983; Pfefferbaum y Rosebloom, 1993) y se caracteriza clínicamente por ataxia e incoordinación de las extremidades inferiores (Victor *et al.*, 1971). Macroscópicamente hay degeneración neuronal en la porción anterior y superior del vermis cerebeloso, que en muchos casos puede extenderse al lóbulo anterior (Victor *et al.*, 1971; 1989). Harding y colaboradores (1998) vieron que además de disminuir la materia blanca del vermis también lo hacían las zonas intermedia y lateral. Microscópicamente, Phillips y colaboradores, (1987, 1990) encontraron una disminución de la densidad de las células de Purkinge que tienen una distribución espinocerebelar. La pérdida neuronal se correlaciona negativamente con la cantidad de alcohol consumido al día (Harding *et al.*, 1998). La deficiencia de tiamina ha sido implicada en la etiología de la degeneración cerebelar relacionada al alcohol, y esto es reversible con la administración de tiamina (Victor *et al.*, 1989), incluso en presencia de alcohol (Victor *et al.*, 1989). Luego puede afectar al cerebelo funcional y estructuralmente (Fadda y Rossetti, 1998).
- *Ganglios basales. No existen evidencias clínicas o anatomopatológicas de que los ganglios basales se dañen en procesos en los que el etanol actúe (Harper y Kril, 1985). Quizás se han visto cambios en el sistema de neurotransmisión (Freund y Ballinger, 1989).
- *Locus ceruleus. Está relacionado con la capacidad del organismo para favorecer la adaptación a estímulos inesperados procedentes del medio externo. Cuando se ingiere etanol aumenta la variabilidad en la respuesta de las neuronas del locus ceruleus a sucesos sensoriales procedentes del exterior, lo que conduce a una pérdida de atención disminuyendo la capacidad para producir las respuestas adaptativas apropiadas (Harper, 1998).

La distribución y extensión de la pérdida neuronal depende de la duración, magnitud y modo de exposición al etanol, de la susceptibilidad genética de las especies y la raza de los individuos estudiados. Aunque todavía es difícil definir los niveles de alcohol que causan cambios, se ha sugerido que la retirada de alcohol puede jugar un papel en el daño cerebral (Cavazos *et al.*, 1994).

Los mecanismos y factores propuestos que contribuyen a la neurodegeneración no están bien conocidos, por eso se habla de posibles mecanismos moleculares del daño cerebral inducido por etanol. El daño cerebral se puede complicar, como ya se ha visto, con las deficiencias nutricionales y por la presencia de otros daños en páncreas, hígado y corazón (Tarter y Edwards, 1985; Butterworth, 1995).

Pero durante mucho tiempo se ha pensado que la acción del etanol sobre el sistema nervioso se debía casi exclusivamente a una acción inespecífica sobre las membranas celulares. La hipótesis, que surgió para explicar los efectos del etanol en el SNC, sugería que el etanol, como molécula anfipática que es, producía una perturbación física de la matriz lipídica de las membranas neuronales, llevando posiblemente a cambios en la actividad de las proteínas unidas a membrana debido a la existencia de interacciones específicas directas con proteínas neuronales que ven alterada su función (Fadda y Rossetti, 1998). Luego dicha desorganización producida en las membranas altera la funcionalidad de sus componentes proteicos y también lipídicos, aumentando la fluidez de membrana, pero a concentraciones farmacológicamente relevantes el efecto del etanol en la fluidez de la matriz lipídica de las membranas es muy pequeño, a veces indetectable (Sánchez-Amate *et al.*, 1992; 1995; Tabakoff *et al.*, 1996). Como se ha visto anteriormente, al encontrarse entre los componentes proteicos diversos tipos de canales iónicos, proteínas transportadoras o proteínas generadoras de segundos mensajeros entre otras, se pueden producir cambios de distinto tipo (Chin y Goldstein, 1981). No obstante, aunque el alcohol entra a las membranas su distribución no es uniforme, y esto sugiere que el sitio de unión, quizás en la interfase proteína-lípidos, puede justificar la acción del alcohol en dosis moderadas (Tabakoff y Hoffman, 1987; Gonzales y Hoffman, 1991). Así, por ejemplo, la exposición aguda al etanol provoca la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje que, como se sabe, participan en la transmisión del impulso nervioso y en la liberación de neurotransmisores e impide la despolarización celular, ya que altas concentraciones de etanol disminuyen la función de la bomba Na⁺-ATPasa y la cadena transportadora de electrones, o modifica el metabolismo de muchos neurotransmisores. Esto conduce a nivel celular a una modificación de la funcionalidad de las neuronas y de las redes neuronales en las que estas se encuentran integradas. Como resultado final, se produce una alteración de la actividad cerebral (Carvey, 1998).

Se ha visto un amplio rango de cambios en el déficit funcional y cognitivo relacionados al alcohol con respecto a los receptores (Shanley y Wilce, 1993) y neurotransmisores aminoacídicos (Thomas *et al.*, 1992). El etanol afecta a un amplio

número de sistemas de receptores en el rango de concentraciones moderadas. Así, en las últimas décadas se han identificado interacciones específicas dosis-dependiente entre el etanol y los sistemas de neurotransmisores más importantes (dopamina (DA), noradrenalina (NA), 5HT, ACh, GABA, Glu y opioides endógenos), al igual que con sistemas de segundos mensajeros, que son muy sensibles a la perturbación por concentraciones de etanol bajas-moderadas. Los efectos farmacológicos del etanol parecen ser la suma de las interacciones con todos estos sistemas. La diferente contribución de cada sistema neurotransmisor así como las variaciones en la dosis/concentración de etanol pueden constituir la base neuroquímica de la dependencia a la dosis de los efectos de comportamiento del etanol. Se ha demostrado que los efectos sedativos, estimulantes, ansiolíticos y de reforzamiento del etanol se dan entre rangos de dosis diferentes y relativamente estrechos (Grant *et al.*, 1990a). Además, a una cierta dosis, un sistema de receptores específico puede ser más prominente que los otros en la contribución a un determinado efecto de comportamiento del etanol (Eckardt *et al.*, 1998).

Más recientemente se ha sugerido que hay proteínas neuronales que son muy sensibles al etanol y han sido llamadas Elementos Receptivos para el Alcohol (ERA) (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997). Entre estos elementos receptivos se encuentran multisubunidades, complejos proteicos unidos a membranas, incluyendo canales iónicos dependientes de ligando y proteínas implicadas en señales neuronales de procesos de transducción (Eckardt *et al.*, 1998).

Algunas de las interacciones más importantes entre el etanol y los sistemas neurotransmisores son las siguientes:

- Sistema GABAérgico. El GABA es un neurotransmisor presente en grandes concentraciones en todo el SNC y también en otros tejidos. Una clase de neuronas inhibitoras lo emplean como neurotransmisor. El etanol potencia la actividad del GABA al actuar sobre sus receptores GABA_A y GABA_B. El complejo del receptor GABA_A (*figura 4*) pertenece a la superfamilia de receptores de canales iónicos dependientes de ligando (ionotrópicos), consistente en una proteína formada por cinco subunidades que se asocian formando un canal transmembranal permeable a iones cloruro con diferentes sitios de reconocimiento de ligandos, incluyendo en estos GABA, barbitúricos, benzodiazepinas, alcohol y neuroesteroides (McDonald y Olsen, 1994; Kandel *et al.*, 2001). Y aunque el etanol no se une directamente a los sitios de reconocimiento de estos ligandos (McDonald, 1995), puede potenciar la neurotransmisión mediada por GABA. Cada subunidad de los canales

receptor de GABA contiene un gran dominio extracelular N-terminal, donde está el sitio de unión del ligando. Se necesitan dos moléculas de GABA para activar a sus respectivos canales (Kandel *et al.*, 2001). Además la estimulación del receptor GABA_A por etanol produce un aumento en la permeabilidad del ión cloruro en la membrana celular produciendo como resultado un incremento del potencial negativo y conduciendo a la hiperpolarización de dicha membrana neuronal, produciéndose así progresivamente ansiolisis, sedación y anestesia; Y esta estimulación que puede producirse por GABA se aumenta por etanol en sinaptosomas y cultivos celulares de cerebro de

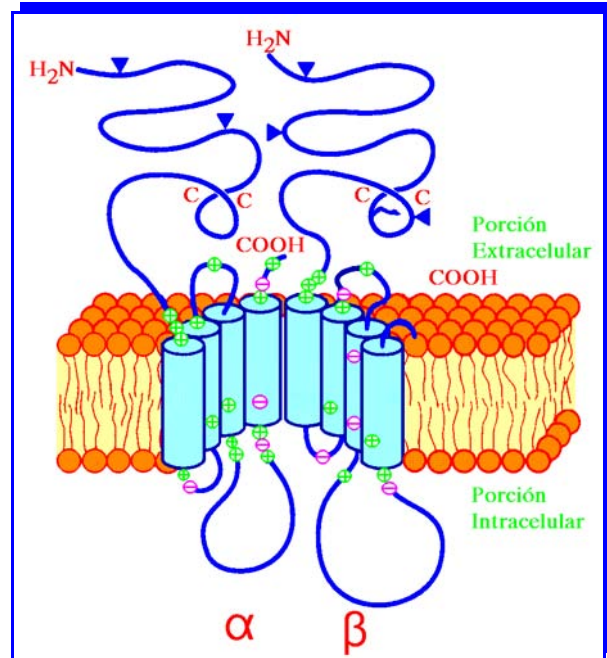


Figura 4. Estructura de las subunidades α y β del receptor GABA_A. El receptor forma un conducto de Cl⁻.

mamíferos (Nestoros, 1980; Suzdak *et al.*, 1986; Ticku *et al.*, 1986; Allan y Harris, 1987; Celentano *et al.*, 1988; Mehta y Ticku, 1988; Aguayo, 1990; Nishio y Narahashi, 1990; Reynolds y Prasad, 1991). Pero el etanol no estimula el flujo de iones cloruro mediante el receptor GABA de forma ubicua en las diferentes regiones cerebrales (Celentano *et al.*, 1988; Aguayo, 1990; Osmanovic y Shefner, 1990; White *et al.*, 1990; Reynolds y Prasad, 1991; Mihic *et al.*, 1992); Dependiendo de la zona cerebral existe una porción relevante de receptores GABA_A insensibles a los efectos estimulantes del etanol en el flujo de iones cloruro (Givens y Breese, 1990). La respuesta funcional del canal al GABA y los moduladores depende de las subunidades que compongan el complejo del receptor (Pritchett *et al.*, 1989). Existen varias familias de subunidades (α , β , γ , δ) y cada subunidad puede tener varios subtipos (α_1 - α_6) (McDonal y Olsen, 1994), esto hace que varíe la composición de los receptores GABA_A regionalmente en el cerebro. Esta respuesta regionalmente diferente de los receptores al etanol se debe a la heterogeneidad del complejo de los receptores GABA_A, en términos de la

composición de subunidades (Givens y Breese, 1990). Esto verifica que las subunidades de los receptores son necesarias para la respuesta del receptor al etanol. Esto sucede a concentraciones 1 mM y las acciones del etanol en la función de los receptores GABA_A puede dar una base para algunos efectos de comportamiento del etanol cuando se da a dosis bajas-moderadas (0.5 g/kg de etanol en ratas potencian los efectos inhibidores del GABA en la actividad neuronal en la corteza inferior colicular) (Simson *et al.*, 1991a). La función del receptor GABA_A se regula alostéricamente por agentes de unión a los sitios de estos receptores. El efecto del etanol puede darse directamente sin necesidad de que este neurotransmisor esté unido a su receptor, al contrario de lo que ocurre con otros compuestos como las benzodiazepinas. Esto podría estar relacionado con la mayor toxicidad y el aumento del número de acciones secundarias del etanol. Que el etanol afecta la neurotransmisión GABAérgica se demuestra al ver que los alcohólicos crónicos tienen niveles reducidos de GABA en plasma y que al morir presentan en su cerebro un número incrementado de receptores de GABA. En cualquier caso, no se conocen las sustancias endógenas que utilizan estos sitios del receptor GABA_A. Esta acción del etanol sobre la neurotransmisión GABAérgica podría ser la responsable de sus efectos sedantes, hipnóticos y supresores del sueño REM, (movimiento rápido de los ojos) sus propiedades anticonvulsivas y su capacidad de inducir amnesia retrógrada. Además, así se explican los efectos depresivos sinérgicos y aditivos que ocurren cuando el etanol y las benzodiazepinas se administran juntos. Por otro lado, el etanol puede bloquear los flujos de Ca²⁺ dependientes de voltaje a través de las membranas celulares, reduciendo la liberación de varios transmisores del SNC deprimiendo así, como antes se ha mencionado, la excitabilidad neuronal. Esto puede aumentar la acción del GABA sobre sus receptores. Wan y colaboradores (1996) sugieren que el receptor GABA_B tiene un papel en la modulación de la interacción entre el etanol y el receptor GABA_A. El receptor GABA_B es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G que se cree que regula la actividad de los canales de K⁺ y Ca²⁺, aumentando la permeabilidad del K⁺ o inhibiendo el canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje, y modula la actividad de la adenilato ciclasa (Kandel *et al.*, 2001). Los receptores GABA_B se localizan principalmente en regiones presinápticas y su actividad disminuye la liberación de GABA (Misgeld *et al.*, 1995). Wan y colaboradores (1996) demostraron que el bloqueo farmacológico del receptor GABA_B descubre el incremento inducido

por etanol de la función del receptor GABA_A en el hipocampo de roedores. Los resultados obtenidos demuestran que algunos efectos del etanol en los receptores GABA_A del hipocampo pueden necesitar un bloqueo de los receptores GABA_B presinápticos (Eckardt *et al.*, 1998).

- Sistema de los aminoácidos excitatorios. La acción excitadora del Glu disminuye al actuar el etanol sobre dos de sus receptores, los denominados NMDA y no NMDA. Ejemplos de estos últimos son el KA (kainato) y el AMPA (ácido " -N-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico). Siendo el NMDA considerado como el más sensible a los efectos del etanol (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989). El receptor NMDA es un complejo macromolecular análogo al GABA_A, es un canal catiónico permeable a Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ con varios sitios farmacológicamente claros en la proteína receptora que también modulan el paso de iones por este canal. Estos sitios incluyen el lugar de reconocimiento del NMDA y Glu, el sitio de unión de la Gly₁, un sitio que une compuestos como la penicilina, un sitio de unión de Mg²⁺ dependiente de voltaje y un sitio modulador que une Zn²⁺ (Mori y Mishina, 1995). Cuando el Glu se une a su receptor NMDA, se abre un canal de Ca²⁺ que en condiciones normales permanece bloqueado por Mg²⁺. Este ión se separa del canal sólo cuando el Glu activa a otro tipo de receptor para Glu, presente en la misma terminal postsináptica, como por ejemplo el KA. Luego el etanol también afecta la función de receptores Glu ionotrópicos (no-NMDA). Aunque estudios iniciales demostraron que el receptor NMDA era el más sensible a la acción del etanol (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989), esto varía al cambiar las condiciones del experimento. Estudios recientes demuestran que la sensibilidad de otros receptores de Glu, como el receptor KA, a la inhibición por etanol es mayor si se usan bajas concentraciones de agonistas (Snell *et al.*, 1994b; Dildy-Mayfield y Harris, 1994a,b) y por lo tanto según la concentración de agonistas los receptores NMDA o no-NMDA pueden ser sensibles a la inhibición por etanol. El receptor NMDA es un conjunto de subunidades, que según el área neuroanatómica del cerebro donde se encuentre tendrá diferente sensibilidad al etanol (Tabakoff y Hoffman, 1996b) y esto se relaciona con las subunidades que componen el receptor, aunque la influencia, según otros estudios, no es muy grande (Tabakoff y Hoffman, 1996b). Existen evidencias de que los receptores que contienen la subunidad NR2B son más sensibles a la inhibición por etanol (Lovinger, 1995; Yang *et al.*, 1996), aunque en trabajos recientes se sugiere que otros factores además de la composición

de subunidades *per se* puede contribuir significativamente a dicha sensibilidad a la inhibición por concentraciones de etanol bajas-moderadas en los receptores NMDA de determinadas regiones cerebrales o tipos celulares. Estos factores pueden ser la influencia de otros moduladores de la función del receptor como la Gly (Rabe y Tabakoff, 1990; Snell *et al.*, 1994a, b; Bhave *et al.*, 1999) y/o la modificación posttranslacional por fosforilación mediada por la proteína kinasa C (PKC). Algunos autores demostraron que el etanol es antagonista selectivo del paso de cationes que va asociado a la estimulación de los receptores NMDA *in vitro* (Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989). La corriente de iones estimulada por NMDA se inhibe por etanol en células del hipocampo dependientes de voltaje. Este efecto del etanol tiene un umbral bajo que además es dependiente de concentración (Lovinger *et al.*, 1989). Otro estudio demostró que el etanol a bajas concentraciones disminuye la entrada de Ca^{2+} estimulada por NMDA (Tabakoff y Von Wartburg, 1975) y produce guanosin-monofosfato cíclico (GMPc) (Hoffman *et al.*, 1989).

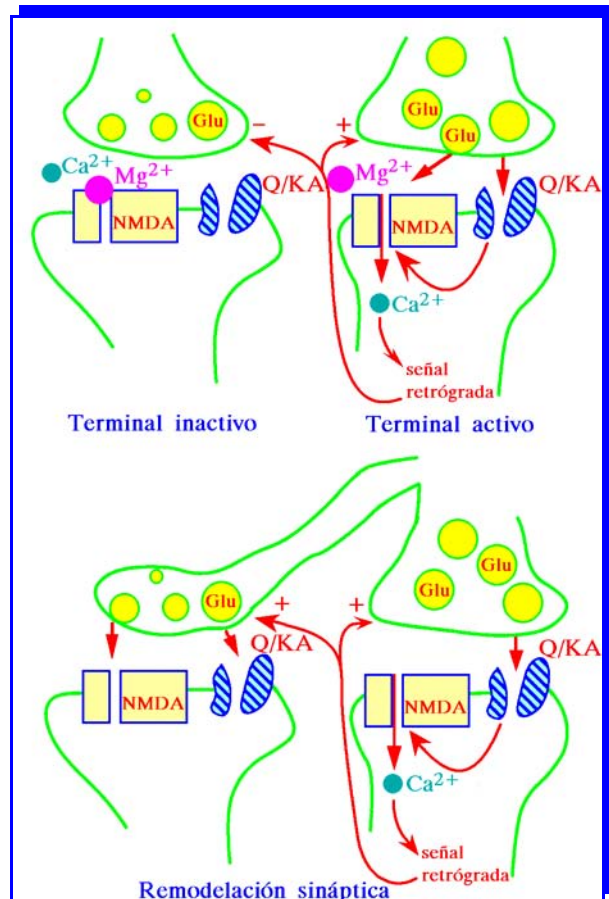


Figura 5. Esquema de la actuación del receptor NMDA y cambios en su plasticidad neuronal.

Estos y otros estudios (White *et al.*, 1990; Dildy-Mayfield y Leslie, 1989;1991; Lovinger *et al.*, 1990) han demostrado la capacidad del etanol para ser antagonista de la liberación de neurotransmisores estimulada por NMDA (Göthert y Fink, 1989; Gonzales y Woodward, 1990; Woodward y Gonzales, 1990; Simson *et al.*, 1991b; Fink *et al.*, 1992; Woodward, 1994). La activación del receptor de Glu puede contribuir a la producción de diversos cambios en la plasticidad sináptica, entre los que se incluyen la aparición y desaparición de contactos sinápticos (*figura 5*), y que pueden conducir a diversas

modificaciones de conducta. Por ejemplo, en el cerebro adulto, la estimulación repetida del receptor NMDA produce un aumento en la eficacia de actuación de la sinapsis, que permanece en el cerebro durante largos periodos de tiempo, y que se conoce como potenciación a largo plazo. Se trata de un proceso relacionado con el aprendizaje y la memoria. Se ha demostrado que exposiciones agudas del tejido del sistema nervioso a bajas concentraciones de etanol (5-10 mM) inhibe la sensibilidad de las neuronas del hipocampo y de las de Purkinje a la actuación del Glu. Esto sugiere que el antagonismo de la conductancia iónica mediada por NMDA puede contribuir a algunos de los efectos fisiológicos o de conducta del etanol así como a la pérdida de memoria producida por el etanol o a la producción de convulsiones que a veces acompañan a la abstinencia de alcohol. Hay otros datos que muestran como a pesar de las bajas concentraciones de etanol se aumenta la respuesta del NMDA en el hipocampo (Lima-Landman y Albuquerque, 1989); el tratamiento crónico con alcohol produce un aumento del número de receptores NMDA y de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que podría aumentar la excitabilidad neuronal. Luego cuando se toma alcohol por primera vez o de una forma esporádica, disminuye la actividad NMDA, mientras que tras la administración crónica aumenta la actividad de estos receptores. Estos datos podrían explicar la hiperactividad producida al dejar de tomar alcohol. Los cambios antes indicados sobre la actividad de los receptores NMDA, después de un consumo prolongado de alcohol, corroboran la hipótesis de que el organismo intenta contrarrestar los efectos producidos en las etapas iniciales de su consumo. El aumento de la actividad NMDA y del número de canales de Ca^{2+} , está enmascarado por la presencia de etanol. Al quedar libres tras la retirada de este último, presentan una actividad que es superior a la existente en una situación normal. Las deficiencias nutricionales (deficiencias en tiamina) y la hiperexcitabilidad de la retirada pueden tener en común un mecanismo molecular de neurotoxicidad unido a la neurotransmisión glutamatérgica aumentada y a la sobreactivación de los receptores NMDA y excitotoxicidad. Y es que la retirada aumenta la neurotransmisión glutamatérgica y por tanto el Glu extracelular (Rossetti y Carboni, 1995), que produce alteraciones neuroadaptativas (Collins *et al.*, 1996) que vienen de la mano de la sobreactivación de los receptores de Glu NMDA (Coile y Puttfarcken, 1993; Lipton y Rosenberg, 1994).

- Sistema peptidérgico. El etanol también tiene afinidad por los receptores κ -opiáceos. Más aún, el metabolito del alcohol, acetaldehído, puede unirse con las catecolaminas para formar unos conjugados denominados tetrahidroisoquinolonas y salsolinol, que tienen funciones semejantes a las de los péptidos opiáceos. Las propiedades de refuerzo del etanol, así como otros efectos cuando está en dosis bajas-moderadas, son mediados por la activación del sistema peptidérgico (Froehlich y Li, 1994). Además, estudios recientes han revelado la implicación del sistema peptidérgico en el control de la estimulación inducida por etanol de la neurotransmisión de DA. Estos compuestos también pueden contribuir a los efectos neurodegenerativos del etanol, que causan pérdidas del tejido neuronal, déficit de memoria, disminución de la agudeza mental o deterioro motor permanente (Collins, 1982). Los efectos agudos de estos también contribuirían a las propiedades analgésicas, euforizantes y sedativas-hipnóticas del etanol. La actividad motora producida por etanol en ratones tiene una influencia genética importante (Phillips *et al.*, 1995). Dicha actividad, tras dosis agudas de etanol, puede implicar la activación del sistema dopaminérgico y peptidérgico. Antagonistas selectivos del receptor de DA bloquean la actividad motora producida por el etanol (Koechling *et al.*, 1990; Broadbent *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1995).
- Sistema catecolaminérgico. Aunque el etanol es un depresor del SNC, su administración aguda provoca la liberación de DA y NA. La liberación de estas catecolaminas contribuye a la acción eufórizante del etanol y su capacidad de inducir dependencia, aunque no está muy clara la acción del sistema noradrenérgico. Cuando se habla de los determinantes neuroquímicos y neuroanatómicos del placer o refuerzo, tienen importancia el sistema dopaminérgico y serotoninérgico del cerebro. Existen evidencias que sugieren que el sistema dopaminérgico mesolímbico media, al menos en parte, las propiedades de refuerzo del etanol (Koob, 1992; Wise 1996). El etanol, además de interactuar con los receptores GABA_A y NMDA, interactúa con la DA (Deitrich *et al.*, 1989; Grant 1994, Samson y Hodge 1996): la administración de etanol se ha demostrado que aumenta la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas (Mereu *et al.*, 1984; Gessa *et al.*, 1985) y la liberación de DA de estas neuronas (Carlsson y Lindquist 1973; Imperato y Di Chiara 1986). También se ha visto que la retirada de etanol va a disminuir esta actividad dopaminérgica (Diana *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996). Por lo tanto, el sistema dopaminérgico mesolímbico

es el mayor candidato para regular las propiedades de refuerzo de las drogas adictivas, incluyendo el etanol, en animales de experimentación y humanos (Koob, 1992; Wise, 1996; Kiyatkin, 1995). Existen estudios que demuestran que la liberación de DA, al estimular con etanol afecta al núcleo caudado, aunque este área del cerebro tiene un umbral mayor para el etanol con el fin de estimular la liberación de DA que en el núcleo accumbens (AC) (Imperato y Di Chiara 1986) donde el bloqueo de la liberación de DA lo hace la (-butirolactona. El sistema dopaminérgico mesocortical surge del área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo y se proyecta a la corteza prefrontal (Björklund y Lindvall, 1984; Goldman-Rakic, 1987). Se ha prestado mucha atención a la corteza prefrontal ya que esta región está implicada en funciones de motivación, cognitivas, etc. (Bartus *et al.*, 1978; Brozoski *et al.*, 1979; Goldman-Rakic y Brown, 1981; Goldman-Rakic, 1987; Wenk *et al.*, 1989). Las neuronas piramidales de la corteza cerebelar forman la base celular para trabajar la memoria y la DA puede modular las funciones cognitivas mediadas por la actividad de la corteza prefrontal (Dolan *et al.*, 1995; Okubo *et al.*, 1997). Luego las alteraciones de la transmisión dopaminérgica son importantes en el déficit cognitivo mediado por dicha corteza prefrontal en la dependencia al etanol. Como ya se ha visto anteriormente, las alteraciones del sistema noradrenérgico respecto al etanol no están bien estudiadas, lo que si se ha demostrado es que existe una pérdida significativa de neuronas en el locus ceruleus (Mayes *et al.*, 1988; Victor *et al.*, 1989) disminuyendo el nivel de NA (Carlsson *et al.*, 1980).

- Sistema indolaminérgico. Se sabe que el etanol estimula el aumento de la actividad serotoninérgica a través de sus receptores 5HT₃, que son activados por ligando. Estos receptores ionotrópicos tienen cuatro segmentos transmembrana que son estructuralmente parecidos a los receptores de la ACh. Estos son permeables a cationes monovalentes y se piensa que participan en la transmisión sináptica excitadora rápida en algunas áreas cerebrales (Kandel *et al.*, 2001). El sistema de la 5HT en el cerebro juega un papel importante mediando los efectos del etanol cuando está en dosis bajas-moderadas. De acuerdo a la relación entre el funcionamiento de la 5HT cerebral y el consumo de etanol, se han encontrado agentes capaces de inhibir la recaptura de 5HT, aumentando la concentración de esta en la hendidura sináptica. Teniendo en cuenta los efectos directos del etanol en la función del receptor serotoninérgico, concentraciones bajas-moderadas de etanol tienen poco efecto en la interacción de la 5HT con varios subtipos de

receptores neuronales, 5HT₁ o 5HT₂ (Buckholtz *et al.*, 1989). Otros estudios indican la existencia de una interacción del etanol con el subtipo 5HT₃. Entre los diferentes subtipos de receptores de 5HT (Peroutka, 1993), este receptor 5HT₃ es el único unido a un canal iónico y se localiza primeramente en regiones mesolímbicas del cerebro (Kilpatrick *et al.*, 1987). La acción del etanol en el receptor 5HT₃ depende de la concentración de 5HT existente y se bloquea con la aplicación de antagonistas específicos de receptor que bloquean la acción del etanol (Lovinger, 1991; Lovinger y White, 1991). Estos datos podrían sugerir la interacción entre el etanol y el sitio de reconocimiento de la 5HT; Además el etanol no altera la unión al receptor 5HT₃, quedando el interrogante de cuál es el mecanismo por el que el etanol interacciona con el receptor 5HT₃ para aumentar la respuesta de la 5HT. Otros estudios han demostrado que la interacción funcional entre los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos pueden jugar un papel importante en el incremento de la liberación de DA en diferentes áreas cerebrales como el AC. Dicha interacción también puede sugerir el mecanismo por el que la 5HT media las propiedades de refuerzo del etanol, debido a que el sistema dopaminérgico-mesolímbico, que inerva al AC, está claramente unido a los efectos de reforzamiento de un número de drogas adictivas (Carboni *et al.*, 1989; Wozniak *et al.*, 1990). Con la hipótesis del papel del receptor 5HT₃ en la mediación de las acciones del etanol en las neuronas dopaminérgicas, se ha demostrado que el bloqueo de los receptores 5HT₃ por antagonistas selectivos reduce voluntariamente la ingesta de etanol (Costall *et al.*, 1990; Fadda *et al.*, 1991b; Kostowski *et al.*, 1993; Tomkins *et al.*, 1995). El sistema serotoninérgico surge principalmente del núcleo de Rafe medio y dorsal, proyectándose principalmente a la corteza, sistema límbico e hipotálamo (Jacobs y Azmitia, 1992).

- Sistema colinérgico. El etanol disminuye la liberación de ACh en la formación reticular produciendo sedación y delirio. Las neuronas colinérgicas son el blanco del etanol en el cerebro (Massarelli, 1979). Otros autores han demostrado que el etanol aumenta la liberación de ACh en la unión neuromuscular acompañándose de un incremento en los potenciales miniatura mediado por la actividad de los receptores colinérgicos nicotínicos que llevan acoplados los canales iónicos. Aracava y colaboradores (1991) mostraron que existía un aumento inducido por etanol en la frecuencia de apertura de los canales simples cuando estos eran activados por ACh. El sistema colinérgico central es parte importante del circuito neuronal de la

memoria, el aprendizaje y la percepción. La mayor fuente de ACh en el cerebro viene de los núcleos del cerebro basal, y se proyecta hacia diferentes regiones cerebrales (Saper, 1987). El núcleo septal medial se proyecta del hipocampo principalmente por el fórnix; la banda diagonal de Broca se proyecta al hipocampo, al bulbo olfatorio y a la corteza límbica; y el núcleo basal de Meynert se proyecta hacia las cortezas frontal, parietal y temporal. En pacientes con el SWK, hay una pérdida significativa de neuronas en los núcleos basales y una reducción de la actividad acetilcolintransferasa en el neocortex y el hipocampo (Arendt *et al.*, 1983; Nordberg *et al.*, 1983).

- Otro ejemplo de las alteraciones moleculares producidas a lo largo de la exposición al etanol es la variación de la actividad de la adenilato ciclasa cerebral. Al principio de su administración, el alcohol la activa, con lo que aumentan los niveles de adenosín-monofosfato cíclico (AMPc) pero tras la exposición crónica se reduce la actividad enzimática. Se ha demostrado que el etanol no solo tiene efectos en los sistemas neurotransmisores que modulan su actividad adenilato ciclasa sino que también, tiene efectos directos en los componentes del sistema de transducción de señales de esta enzima, que sirven para afectar las interacciones entre varios neurotransmisores y regular los niveles neuronales de AMPc. La adición de etanol en forma aguda a las células o a preparados de membranas celulares lleva al aumento de la actividad de agonistas de la adenilato ciclasa. Existen nueve isoformas de esta enzima que muestran diferente sensibilidad al efecto estimulador del etanol, el tipo más sensible es la isoforma VII (Yoshimura y Tabakoff, 1995). Se ha sugerido que la proteína G estimuladora (Gs) está implicada en la acción del etanol (Tabakoff y Hoffman, 1998) debido a que la actividad de la adenilato ciclasa está modulada por receptores acoplados a proteínas G. La acción del etanol puede estar mediada en parte por la activación de la proteína Gs, y esta acción del etanol parece promover la interacción de la proteína G con la parte catalítica de la adenilato ciclasa, siendo la magnitud del efecto dependiente de la isoforma que exista en la célula. Estos datos sugieren que la actividad de este enzima en diferentes tejidos y regiones cerebrales puede ser estimulada sustancialmente por concentraciones de etanol bajas-moderadas, dependiendo de la isoforma expresada en ese tejido (Yoshimura y Tabakoff, 1995). Esta enzima genera AMPc, que es un segundo mensajero distribuido en casi todas las células del organismo incluyendo el SNC. La estimulación en la producción del AMPc en el cerebro por el etanol probablemente se afecte por un gran número de

neurotransmisores, pero la magnitud del efecto del etanol variará dependiendo de la expresión local de las diferentes isoformas de la adenilato ciclasa. La interacción del etanol con el sistema generador de AMPc ha sido implicado en el desarrollo de la tolerancia (Szabó *et al.*, 1988a; Tabakoff y Hoffman, 1998). Además la acción neuroquímica de dosis de etanol bajas-moderadas sobre la actividad de la adenilato ciclasa da una visión neuroadaptativa en el SNC (Eckardt *et al.*, 1998).

Si resumimos los datos de los efectos neuroquímicos del etanol (>20 mM), se aprecia que un sistema importante de neurotransmisores, que puede ser caracterizado como un canal iónico dependiente de receptor, es importante para mediar los efectos de tales concentraciones de etanol. Ejemplos son el receptor GABA_A, el NMDA y posiblemente otros receptores de Glu, los receptores colinérgicos nicotínicos y los receptores de 5HT₃. Las señales de transducción tales como aquellas que están implicadas en la adenilato ciclasa y la PKC también ejercen una contribución importante. La actividad de neuronas dopaminérgicas, principalmente las mesolímbicas, parecen ser particularmente sensibles a la acción del etanol, pero cambios en la actividad neuronal dopaminérgica inducidos por etanol pueden implicar acciones del etanol en otros sistemas neurotransmisores, como el serotoninérgico, peptidérgico y colinérgico. El sistema de transducción de señales que genera AMPc puede alterarse por niveles moderados de etanol y puede participar en ciertas acciones agudas del etanol, pero esto puede participar también en las consecuencias neuroadaptativas (tolerancia) de la ingesta de etanol (Eckardt *et al.*, 1998).

1.4. Enzimas Proteolíticos Reguladores de Neuropeptidos.

El creciente número de péptidos descubiertos, localizados tanto en el SNC como en tejidos periféricos, ha provocado numerosos estudios destinados a la mejor comprensión de su fisiología. Especial interés han suscitado los mecanismos por los que los neuropeptidos son inactivados tras su liberación a la hendidura sináptica. Los procesos de inactivación de los neuropeptidos están relacionados con su función neurotransmisora y neuromoduladora. De hecho, un neuropeptido que ejerza un papel neurotransmisor tendrá una vida corta, mientras que la función neuromoduladora implica un retraso en los mecanismos de degradación para permitir a los péptidos cumplir su función (Checler, 1993).

En general, los enzimas proteolíticos son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Existen varios términos que, aunque tuvieron mínimas

diferencias de significado (McDonald y Barret, 1986), hoy se utilizan indistintamente junto al de enzimas proteolíticos y son proteasas, proteinasas y peptidasas (Barret *et al.*, 1998).

Clásicamente los enzimas proteolíticos se dividieron en exopeptidasas y endopeptidasas. Los primeros hidrolizan los enlaces próximos a los extremos N- o C-terminal de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actuarían sobre enlaces distintos de los extremos de la cadena.

Las endopeptidasas se dividieron en base al metabolismo catalítico en: Serina endopeptidasa, cistina endopeptidasa, aspártico endopeptidasa y metalopeptidasas.

Las exopeptidasas se clasifican de acuerdo a la especificidad que muestran por un determinado sustrato y se les suele asignar un nombre convencional que indica el extremo del péptido (grupo "-amino o "-carboxilo) frente al cual son activos y el tamaño del fragmento liberado (aminoácido, dipéptido o tripéptido aislado).

Las exopeptidasas que requieren un grupo "-amino libre se denominan aminopeptidasas si liberan aminoácidos y dipeptidil aminopeptidasas y tripeptidil aminopeptidasas si liberan dipéptidos y tripeptidos respectivamente.

Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxilo terminal no sustituido en los péptidos se denominan carboxipeptidasas si liberan aminoácidos y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos.

Un tercer grupo de exopeptidasas son las denominadas dipeptidasas y tripeptidasas, cuyo principal atributo es su especificidad por sustratos que poseen una determinada distancia (de dos o tres aminoácidos respectivamente) entre el grupo "-amino libre y el grupo "-carboxilo libre. Esto da lugar a confusiones, ya que ciertas dipeptidasas y tripeptidasas parecen afectar a cadenas polipeptídicas mayores (Coffey y de Duve, 1968) y algunas aminopeptidasas pueden utilizar como sustratos dipéptidos y tripéptidos de diversa naturaleza (Felfenhauer y Glenner, 1966; Kania *et al.*, 1977).

Las omega peptidasas agrupan a aquellas exopeptidasas capaces de separar residuos terminales cuyo grupo "-amino o "-carboxilo no se encuentra libre porque esté ciclado (p.ej. piroglutamato aminopeptidasa), sustituido o unido a otros residuos terminales que formen enlace mediante un grupo carboxilo o amino no unido a un carbono " ((-glutamato aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las aminopeptidasas se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un residuo N-terminal característico. De igual modo, los nombres asignados a las carboxipeptidasas que

liberan aminoácidos individuales sirven para identificar el residuo carboxi-terminal preferido o requerido por el enzima.

A continuación, siguiendo la clasificación de Barret y col (1998) se exponen brevemente las características de las aminopeptidasas analizadas en el presente estudio:

- * Aminopeptidasa A (APA). También se denomina actividad angiotensinasa, debido a que uno de sus sustratos fisiológicos más importantes es la angiotensina II (Ang II), que por la acción de este enzima es transformada en Ang III, mediando de esta forma los efectos del sistema renina-angiotensina y por tanto la homeostasis de la presión sanguínea (Wolf *et al.*, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).
- * Aminopeptidasa N (APN) o alanina aminopeptidasa. No tiene una función fisiológica totalmente conocida, aunque se la ha relacionado especialmente con el metabolismo de las encefalinas y de otros neuropéptidos como la sustancia P y la interleukina 8. Este enzima también participa en la regulación de la presión sanguínea, tanto a nivel local como periférico, ya que lleva a cabo, junto con la aminopeptidasa B, el metabolismo de la angiotensina III (Ang III), uno de los péptidos efectores del sistema renina-angiotensina (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).
- * Oxitocinasa. Se trata de una ectoenzima que degrada fundamentalmente vasopresina y también oxitocina, siendo por esta última por la que ha recibido su denominación. A nivel del sistema nervioso central, se ha relacionado a la oxitocina con los fenómenos de adicción y tolerancia a drogas, incluido el alcohol.
- * Piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP), también conocida como pirrolidón carboxipeptidasa. Este enzima libera residuos piroglutamilo N-terminales de péptidos biológicamente activos, fundamentalmente de la TRH y la GnRH.
- * Encefalinasa. Esta enzima ha sido descrita exclusivamente en neuronas del SNC de cerebro de ratas (corteza e hipocampo), pero no en tejidos periféricos. Su enriquecimiento en sinaptosomas y terminaciones nerviosas sugiere que juega un papel importante en la neurotransmisión y diferenciación sináptica. degradando a las encefalinas.

El estudio del papel funcional de las aminopeptidasas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y a nivel no sólo central sino también periférico permite utilizarlas como herramientas para estudiar indirectamente la función de los neuropéptidos a los cuales regulan así como analizar los mecanismos básicos de

su propia regulación. Por tanto, el presente trabajo pretende analizar el efecto del alcohol a distintas concentraciones, y bien en condiciones agudas o en condiciones crónicas, sobre las actividades específicas de la aminopeptidasa A, aminopeptidasa N, oxitocinasa, pGluAP y encefalinasa, en cultivos de neuronas y células astrogliales humanas (Neuroblastoma NB69 y astroglioma U373), así como las diferencias que pudieran encontrarse entre ambos tipos celulares.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Cultivos Celulares.

En el presente estudio se han utilizado dos líneas celulares humanas, de neuroblastoma (NB69) y astroglioma (U373). La línea celular NB69 se cultivó en DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) suplementado con un 15% de suero bovino fetal; la línea celular U373 se cultivó en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Ambos medios de cultivo contenían penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (0.1 mg/ml). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. La contaminación por micoplasmas fue descartada empleando Hoescht 33528.

2.2. Protocolo Experimental.

La administración de alcohol a las células de neuroblastoma NB69 y astroglioma U373 se llevó a cabo según dos protocolos experimentales:

- * Exposición aguda. En este protocolo, se deja crecer a las células durante 24 horas, tras las cuales se elimina el medio de cultivo y se añade medio de cultivo nuevo, que contiene alcohol etílico 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM. Las células se incuban durante 60 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se procede a la determinación de las actividades aminopeptidasas.
- * Exposición crónica. En este protocolo, se deja crecer a las células durante 24 horas en un medio de cultivo que contiene alcohol etílico 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM. Posteriormente se procede a la determinación de las actividades aminopeptidasas.

2.3. Determinación de las Actividades Aminopeptidasas.

La actividad de los enzimas APA, APN, oxitocinasa, pGluAP y encefalinasa se ha llevado a cabo utilizando como sustratos glutamil-β-naftilamida (GluNNap), alanina-β-naftilamida (AlaNNap), cistina-β-naftilamida (CysNNap), piroglutamil-β-naftilamida (pGluNNap) y tirosil-β-naftilamida (TyrNNap) respectivamente, de acuerdo con métodos previamente descritos. Así, pasado el tiempo de los

protocolos experimentales anteriormente citados, se elimina el medio de cultivo, y las células se incuban durante 30 minutos (APN, oxitocinasa y encefalinasa) o 120 minutos (APA y pGluAP) a 37°C con 1 mL de la solución de incubación, que contiene 100 mM de GluNNap, AlaNNap, CysNNap, pGluNNap o TyrNNap en el correspondiente medio de cultivo sin suero. Todas las reacciones se finalizaron añadiendo 1 mL de tampón acetato 0.1 M (pH 4.2). La β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se determinó fluorimétricamente, con una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión de 410 nm. El número de células se cuantificó mediante el método de la sulforrodamina B (ver más adelante). Las actividades aminopeptidasa específicas, se expresan como picomoles de GluNNap, AlaNNap, CysNNap, pGluNNap o TyrNNap hidrolizados por minuto y por 10^6 células, usando una curva estándar de β -naftilamina bajo las correspondientes condiciones experimentales antes descritas. Previamente se comprobó que estos ensayos por fluorimetría eran lineales con respecto al tiempo de hidrólisis y al número de células. Todos los productos químicos utilizados fueron suministrados por Sigma (Madrid).

2.4. Sulforrodamina B.

Tras el análisis de las distintas actividades aminopeptidasas, se eliminó el medio de los cultivos, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) y se fijó con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar el TCA. Se dejaron secar las placas y las células así fijadas se tiñeron durante 20 minutos con sulforrodamina B (SRB) al 0.4% en ácido acético al 1%. Tras finalizar el periodo de tinción, la SRB se eliminó y se lavaron los cultivos con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido. Se dejaron secar las placas, y el colorante unido se solubiliza con tampón Tris 10 mM, pH 10.5 y se mide la densidad óptica en un lector de placas a 530 nm de longitud de onda. La respuesta fotométrica fue lineal con respecto a la concentración de colorante y proporcional al número de células, contadas en paralelo con un hemocitómetro.

2.5. Análisis estadístico.

Para analizar las diferencias entre los grupos considerados (células control y células incubadas con alcohol 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM, en condiciones agudas y crónicas), se ha utilizado un análisis múltiple de la varianza (MANOVA), seguido de un test de rango múltiple de Newman-Keuls. Para ello se ha utilizado el software Statgraphics 7.0. Valores de P menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS.

3.1. Efecto del alcohol sobre la actividad específica aminopeptidasa A (APA).

El análisis de los efectos del alcohol sobre la actividad específica APA muestra los siguientes resultados: en células de neuroblastoma NB69 (figura 6) y en condiciones agudas, el alcohol provoca una inhibición dosis-dependiente, que es significativa ($p < 0.01$) a partir de la concentración más baja de alcohol (10 mM). De hecho, a concentraciones de alcohol iguales o superiores a 50 mM, los niveles de APA se hacen indetectables. Por otro lado, en condiciones crónicas (exposición de las células al alcohol durante 24 horas), el alcohol también provoca una disminución significativa ($p < 0.01$) de la actividad específica APA, que es dosis-dependiente, a partir de una concentración de alcohol 50 mM. En células de astroglioma U373 (figura 7) y en condiciones agudas, el alcohol también muestra un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.01$), que es máximo a una concentración de alcohol 25 mM. A concentraciones mayores (50-100 mM), se mantiene el efecto inhibitor del alcohol, pero con menor potencia. Este patrón se repite cuando se administra el alcohol a las células durante 24 horas.

Aminopeptidasa A Neuroblastoma NB69

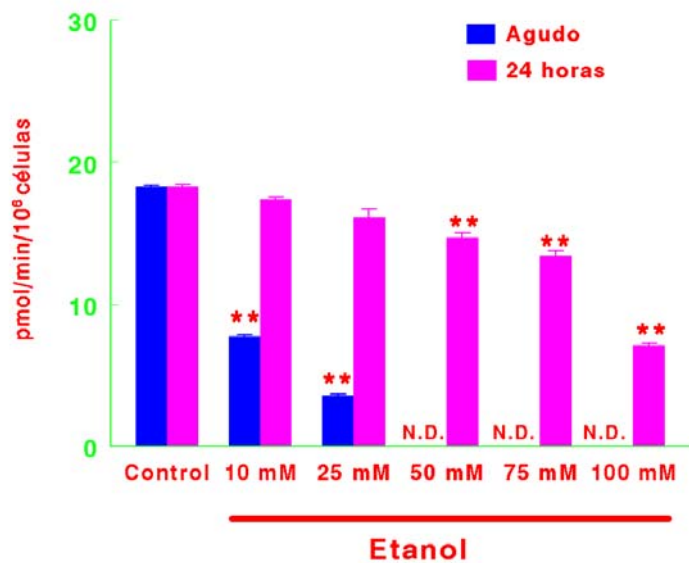


Figura 6. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica aminopeptidasa A (APA) en células de neuroblastoma NB69 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de glutamil-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; **p<0.01).

Aminopeptidasa A Astrogloma U373

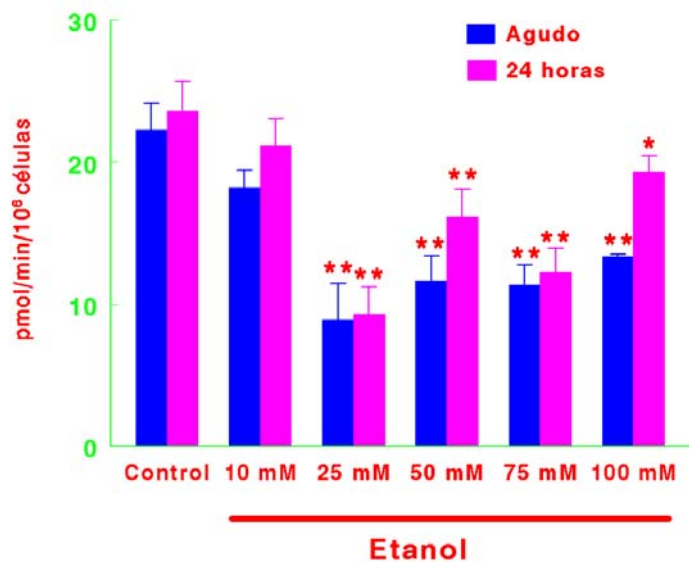


Figura 7. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica aminopeptidasa A (APA) en células de astrogloma U373 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de glutamil-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

3.2. Efecto del alcohol sobre la actividad específica aminopeptidasa N (APN).

El análisis de los efectos del alcohol sobre la actividad específica APN muestra los siguientes resultados: en células de neuroblastoma NB69 (figura 8) y en condiciones agudas, el alcohol provoca una inhibición dosis-dependiente, que es significativa a partir de una concentración de alcohol 25 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para concentraciones 50-100 mM). Del mismo modo, en condiciones crónicas (exposición de las células al alcohol durante 24 horas), el alcohol también provoca una disminución significativa de la actividad específica APN, que es dosis-dependiente, a partir de una concentración de alcohol 25 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para concentraciones 50-100 mM). Por otro lado, en células de astroglioma U373 (figura 9) y en condiciones agudas, el alcohol muestra un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.01$) a partir de una concentración 25 mM, si bien la potencia inhibitoria se mantiene con las concentraciones de alcohol 50-100 mM. Por el contrario, la exposición de las células U373 al alcohol durante 24 horas (condiciones crónicas) no muestra ningún efecto significativo sobre la actividad APN a ninguna de las concentraciones utilizadas.

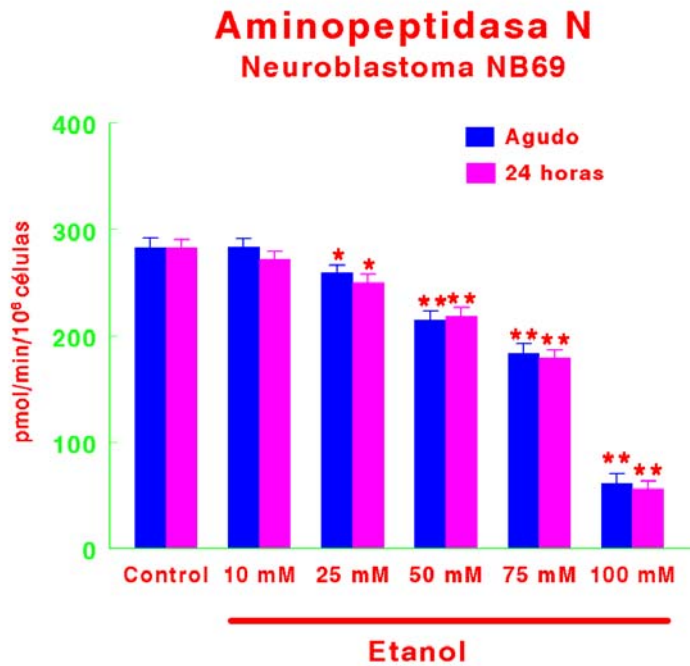


Figura 8. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica aminopeptidasa N (APN) en células de neuroblastoma NB69 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de alanina-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

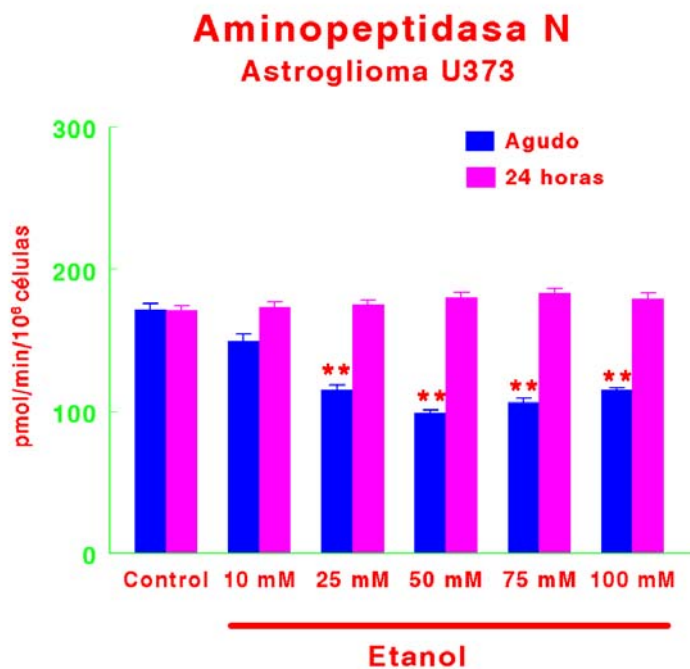


Figura 9. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica aminopeptidasa N (APN) en células de astrogloma U373 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de alanina-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; **p<0.01).

3.3. Efecto del alcohol sobre la actividad específica oxitocinasa.

El análisis de los efectos del alcohol sobre la actividad específica oxitocinasa muestra los siguientes resultados: en células de neuroblastoma NB69 (figura 10) y en condiciones agudas, el alcohol provoca una inhibición dosis-dependiente, que es significativa a partir de una concentración de alcohol 75 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para la concentración 100 mM). Del mismo modo, en condiciones crónicas (exposición de las células al alcohol durante 24 horas), el alcohol también provoca una inhibición dosis-dependiente de la actividad específica oxitocinasa, que es significativa a partir de una concentración de alcohol 10 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para concentraciones 25-100 mM). Por otro lado, en células de astroglioma U373 (figura 11) y en condiciones agudas, el alcohol muestra un efecto inhibidor significativo ($p < 0.05$) a partir de una concentración 25 mM, si bien la potencia inhibidora se mantiene o, incluso disminuye, con las concentraciones de alcohol 50-100 mM. Del mismo modo, la exposición de las células U373 al alcohol durante 24 horas (condiciones crónicas) muestra un patrón similar al obtenido para las condiciones agudas, si bien la potencia inhibidora sobre la actividad oxitocinasa es mayor en estas condiciones ($p < 0.01$), y a partir de las concentraciones más bajas de alcohol utilizadas (10 mM).

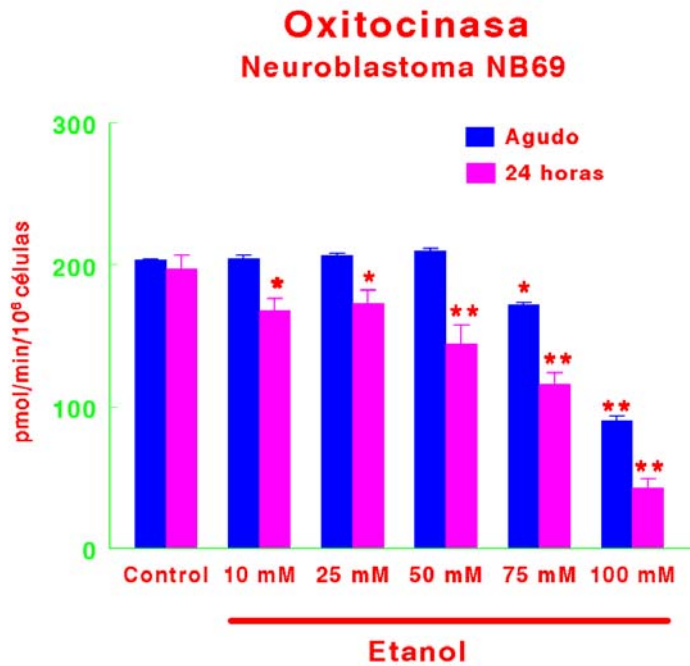


Figura 10. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica oxitocinasa en células de neuroblastoma NB69 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de cistina-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

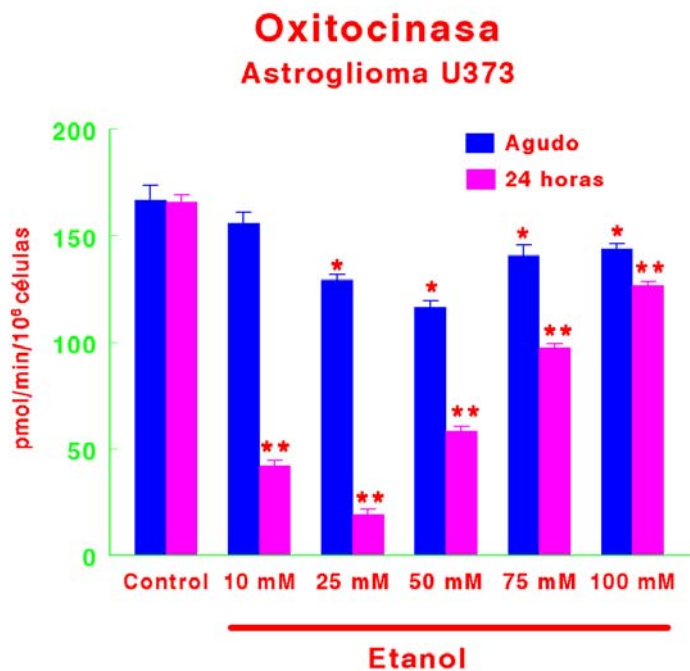


Figura 11. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica oxitocinasa en células de astrogloma U373 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de cistina-\$naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media±SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

3.4. Efecto del alcohol sobre la actividad específica piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP).

El análisis de los efectos del alcohol sobre la actividad específica piroglutamato aminopeptidasa (pGluAP) muestra los siguientes resultados: en células de neuroblastoma NB69 (figura 12) y en condiciones agudas, el alcohol provoca una inhibición dosis-dependiente, que es significativa a partir de la concentración de alcohol más baja utilizada (10 mM; $p < 0.01$). Del mismo modo, en condiciones crónicas (exposición de las células al alcohol durante 24 horas), el alcohol también provoca una inhibición dosis-dependiente de la actividad específica pGluAP, que es significativa a partir de una concentración de alcohol 25 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para concentraciones 50-100 mM). Por otro lado, en células de astroglioma U373 (figura 13) y en condiciones agudas, el alcohol muestra un efecto inhibitorio significativo ($p < 0.05$) a partir de una concentración 10 mM, si bien la potencia inhibitoria se mantiene o, incluso disminuye, con las concentraciones de alcohol 75-100 mM. Del mismo modo, la exposición de las células U373 al alcohol durante 24 horas (condiciones crónicas) muestra un patrón similar al obtenido para las condiciones agudas, si bien la potencia inhibitoria del alcohol es ligeramente inferior.

Piroglutamato Aminopeptidasa Neuroblastoma NB69

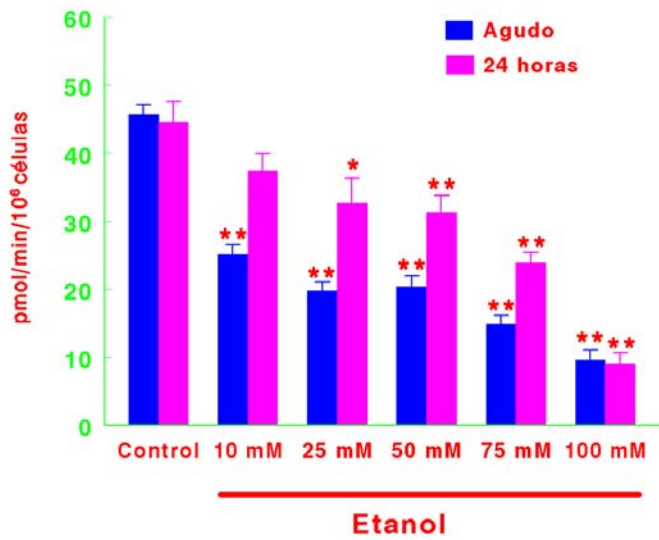


Figura 12. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica piroglutamato-aminopeptidasa (pGluAP) en células de neuroblastoma NB69 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamil-\$\gamma\$-naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media \pm SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

Piroglutamato Aminopeptidasa Astrogloma U373

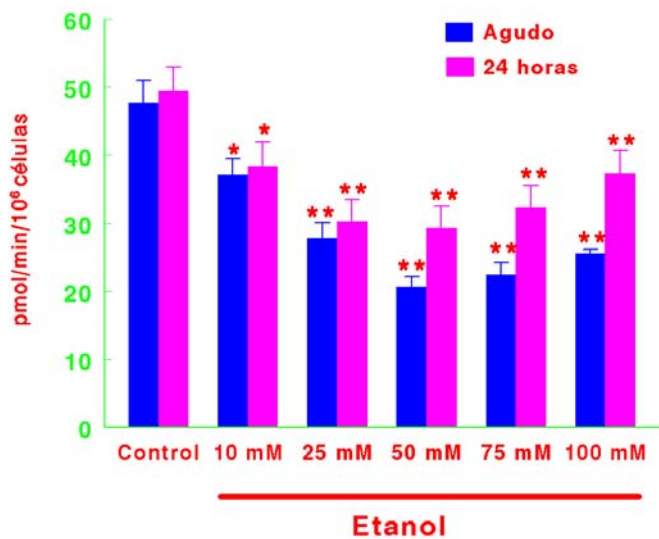


Figura 13. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica piroglutamato-aminopeptidasa (pGluAP) en células de astrogloma U373 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de piroglutamil-\$\gamma\$-naftilamida hidrolizados por minuto y por 10⁶ células (Media \pm SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

3.5. Efecto del alcohol sobre la actividad específica encefalinasa.

El análisis de los efectos del alcohol sobre la actividad específica encefalinasa muestra los siguientes resultados: en células de neuroblastoma NB69 (figura 14) y en condiciones agudas, el alcohol provoca una inhibición dosis-dependiente, que es significativa a partir de la concentración de alcohol 25 mM ($p < 0.05$; $p < 0.01$ para concentraciones 50-100 mM). Del mismo modo, en condiciones crónicas (exposición de las células al alcohol durante 24 horas), el alcohol también provoca una inhibición dosis-dependiente de la actividad específica encefalinasa, que es significativa a partir de una concentración de alcohol 25 mM ($p < 0.01$ para todas las concentraciones). De particular interés es el potente efecto inhibitor sobre la actividad encefalinasa de la concentración de alcohol 100 mM en estas condiciones crónicas. Por otro lado, en células de astroglioma U373 (figura 15) y en condiciones agudas, el alcohol muestra un efecto inhibitor significativo ($p < 0.01$) a partir de una concentración 25 mM, si bien la potencia inhibitor se mantiene con el resto de concentraciones de alcohol utilizadas (50-100 mM). Por el contrario, la exposición de las células U373 al alcohol durante 24 horas (condiciones crónicas) no muestra ningún efecto significativo sobre la actividad encefalinasa, a ninguna de las concentraciones utilizadas.

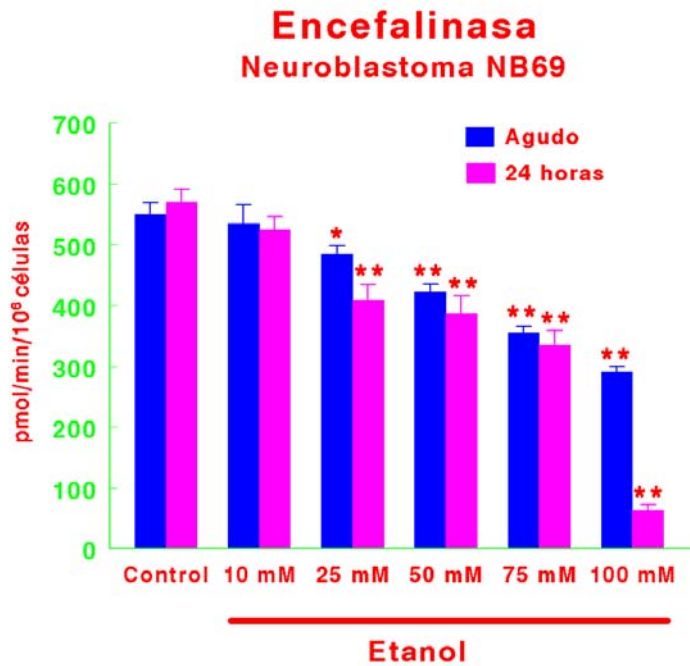


Figura 14. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica encefalinasa en células de neuroblastoma NB69 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de tirosina- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por 10^6 células (Media \pm SEM; n=4; *p<0.05; **p<0.01).

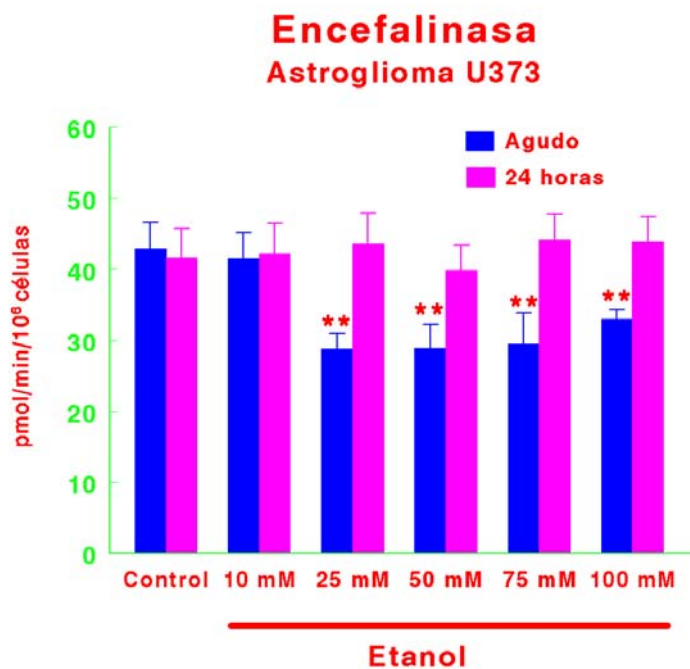


Figura 15. Representación del efecto del alcohol a concentraciones 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM sobre la actividad específica encefalinasa en células de astrogloma U373 en condiciones agudas o tras la exposición durante 24 horas. Los resultados se expresan en picomoles de tirosil- β -naftilamida hidrolizados por minuto y por 10^6 células (Media \pm SEM; n=4; **p<0.01).

4. DISCUSIÓN.

Durante mucho tiempo se ha pensado que el mecanismo de acción del alcohol a nivel molecular se basa en la alteración del orden de las membranas biológicas, incrementando su fluidez (Sánchez-Amate *et al.*, 1992; 1995) y, posiblemente, perturbando la función de las proteínas que se hallan insertas en la membrana (Diamond y Gordon, 1997; Eckardt *et al.*, 1998). Sin embargo, las dosis de alcohol necesarias para producir estos efectos han sido siempre relativamente altas, por encima de 50 mM, e incluso hasta niveles de 200 mM y 400 mM.

Sin embargo, cada vez hay más evidencias que sugieren que dosis mas bajas de alcohol pueden actuar directamente sobre proteínas concretas y, más específicamente, sobre canales operados por receptor, como los del GABA o glutamato. Mas aun, diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* sugieren que el etanol a concentraciones consideradas no tóxicas e incluso inferiores, inhiben la función de los canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales representarían una diana especialmente importante del alcohol dentro del SNC (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997). Es por esta razón que en el presente trabajo se ha utilizado un amplio rango de concentraciones de alcohol y se ha analizado su influencia sobre un amplio rango de actividades aminopeptidasas encargadas de la degradación de diversos neuropéptidos.

De este modo, el presente estudio muestra la capacidad del alcohol de modificar la actividad de diversas aminopeptidasas, fundamentalmente con un efecto inhibitorio dosis-dependiente, de un modo diferente en neuronas y astrogliá y dependiente de su actuación aguda o crónica (dependiendo de la actividad analizada).

Estos cambios observados podrían deberse a un efecto directo del alcohol o sus metabolitos sobre las distintas actividades aminopeptidasas o bien a su influencia sobre los constituyentes de las membranas celulares. Como hemos citado anteriormente, está bien descrito que el alcohol incrementa la fluidez de la membrana y cambia su composición lipídica, alterando una amplia variedad de funciones de las proteínas insertas en ella. Profundizando en este tema, indicar que durante mucho tiempo se ha pensado que los efectos del alcohol sobre el SNC se debían a su naturaleza anfipática, que produciría una perturbación física de la matriz lipídica de las membranas neuronales y daría lugar a cambios en la actividad de las proteínas unidas a membrana (Eckardt *et al.*, 1998). Sin embargo, a concentraciones fisiológicas importantes (10- 20 mM), el efecto del alcohol en la fluidez de membrana es muy pequeño o casi indetectable, y no mayor del que podría esperarse por la simple variación diaria de la temperatura corporal (Tabakoff

et al., 1996). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que existen proteínas neuronales que son muy sensibles al alcohol y que se han denominado elementos receptivos para el alcohol (ERA) (Tabakoff y Hoffman, 1987; Mihic *et al.*, 1997). Entre estos ERA se encuentran diversas subunidades, complejos proteicos de membrana como canales iónicos operados por ligando y otras proteínas implicadas en los procesos neuronales de transducción de señales. Cabe, por tanto, la posibilidad de que las aminopeptidasas formen parte de este grupo de proteínas diana que puede considerarse como ERA.

En este estudio también observamos un comportamiento diferencial de los astrocitos frente a las neuronas, consistente en un comportamiento bifásico, dependiente de la concentración de etanol utilizada. En este sentido, hay que considerar que los efectos del alcohol son la suma de la interacción con múltiples sistemas neurotransmisores/neuromoduladores (dopamina, serotonina, GABA, glutámico y neuropéptidos). Sin embargo, la contribución diferencial de cada sistema neurotransmisor conforme la concentración de alcohol varía, puede constituir la base neuroquímica de la dosis-dependencia y/o los comportamientos bifásicos de los efectos del alcohol. Así, a una cierta dosis un sistema neurotransmisor/receptor específico puede ser más prominente que otro en contribuir a un efecto particular del alcohol. De hecho, diversos estudios muestran en sinaptosomas de corteza frontal de ratón este comportamiento bifásico en diversas actividades aminopeptidasas, por lo que los resultados obtenidos nos permiten sugerir que es la glía, probablemente, la responsable de estos comportamientos.

Los conocimientos sobre la influencia del alcohol sobre la actividad aminopeptidasa cerebral son escasos. Witek y Kolataj han descrito en cerebro de ratón una inhibición de la actividad AlaAP y oxitocinasa que depende tanto de la concentración de alcohol administrada como de la duración del tratamiento (Witek y Kolataj, 1999). Sin embargo, sí se conoce más sobre el efecto del alcohol sobre la actividad aminopeptidasa sérica, donde se ha encontrado un potente efecto inhibitor del principal metabolito del alcohol, el acetaldehído, aunque no del alcohol por sí mismo (Brecher *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que las modificaciones en la actividad AP descritas en el presente trabajo podrían ser consecuencia de la acción del acetaldehído más que del alcohol, ya que este podría generarse como consecuencia del metabolismo celular (Zimatkin y Dietrich, 1997). Este aspecto necesitaría, por tanto, una investigación más profunda.

Las variaciones en las distintas actividades aminopeptidasas analizadas en el presente estudio reflejan el estado funcional de sus correspondientes sustratos, pertenecientes a diversos sistemas neurotransmisores/neuromoduladores.

Uno de estos sistemas es el de los péptidos opiáceos del tipo de las encefalinas, susceptibles de ser hidrolizados por la APN y encefalinasa (Schnebli *et al.*, 1979; Hersh, 1985; Wagner *et al.*, 1981; Berg y Marks, 1989). Se sabe que, en general, estos péptidos (β -endorfina, encefalinas y dinorfinas) están implicados en el abuso de alcohol (Blum *et al.*, 1989), si bien hay una fuerte influencia de las características genéticas de los animales (Gianoulakis y Gupta, 1985). Se ha demostrado que la administración crónica de alcohol en ratas muestra un incremento de los niveles de encefalinas en la corteza cerebral, si bien aparece una disminución a nivel del estriado, el tálamo y la médula oblonga. Esta disminución no tiene lugar, sino que, por el contrario, ocurren incrementos en los niveles, si la administración no es prolongada (Burov *et al.*, 1983). También se ha descrito que los niveles de encefalinas se incrementan en todas las regiones cerebrales de ratas con síndrome alcohólico fetal (Nelson *et al.*, 1988). Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyarían estas observaciones, ya que la inhibición de estas actividades APs aumentarían los niveles de sus sustratos, potenciando su acción. Por otro lado, en condiciones despolarizantes, se ha comprobado que la administración repetida de alcohol reduce la liberación evocada por potasio de encefalinas en el hipotálamo. Esto podría implicar la existencia de una modulación como consecuencia de la exposición –crónica pero no aguda-- al alcohol, de la sensibilidad de distintas poblaciones neuronales al efecto despolarizante del potasio (Przewlocka y Lason, 1991). Esta sensibilidad alterada podría ser también el reflejo de un comportamiento diferencial de los receptores específicos, como se ha sugerido para los receptores de encefalinas de tipo μ pero no para los de tipo δ (Przewlocka y Lason, 1990). El hecho de que en el presente trabajo se encuentre una disminución de las actividades APN y encefalinasa, podría ser reflejo también de estos fenómenos.

Otros sistemas neurotransmisores/neuromoduladores importantes son los mediados por la oxitocina y la vasopresina, péptidos ambos susceptibles de ser hidrolizados por la oxitocinasa (Itoh y Nagamatsu, 1995). La oxitocina es un neuropéptido neurohipofisiario sintetizado en el cerebro y secretado por la hipófisis posterior, que también es liberado a nivel del SNC. Este neuropéptido está asociado, junto con otros, con distintos procesos adaptativos del SNC relacionados con la adicción al alcohol, donde actúa inhibiendo la tolerancia al alcohol. En el SNC, la tolerancia al alcohol parece ser un proceso combinado de componentes celulares y comportamentales, que tiene relación con el aprendizaje, ya que los animales muestran tolerancia sólo en el ambiente donde se les administró inicialmente el alcohol, pero no en un ambiente nuevo (Kovacs *et al.*, 1998). Un modelo adecuado

para investigar este fenómeno consiste en el desarrollo de una tolerancia rápida al efecto hipotérmico del alcohol (Szabó *et al.*, 1988; 1989). Pues bien, la administración de oxitocina evita el desarrollo de tolerancia al etanol en ratones, de forma especialmente potente si se administra a nivel central (Szabó *et al.*, 1989). Esto apoya la teoría de que la oxitocina actúa sobre el SNC para influenciar la respuesta adaptativa a las drogas.

La administración central de oxitocina a dosis que inhiban el desarrollo de una rápida tolerancia al alcohol, incrementa, además, los niveles de noradrenalina en el hipotálamo, de dopamina en el estriado y la médula oblonga y de serotonina en el hipocampo y el estriado (Szabó *et al.*, 1988), es decir, que afecta profundamente a la neurotransmisión por monoaminas. El mecanismo de acción del alcohol sobre estos neurotransmisores en el SNC no está claro. Parece ser que tanto la neurotransmisión serotoninérgica como la dopaminérgica se alteran durante la inhibición de la tolerancia provocada por la oxitocina (Szabó *et al.*, 1988).

Parece claro, pues que este y quizá otros neuropéptidos modulan la respuesta al alcohol en particular y a las drogas de abuso en general. En el caso de la oxitocina, su efecto es inhibir el desarrollo de la tolerancia al alcohol. Así, el alcohol podría actuar sobre el sistema nervioso central a través de múltiples mecanismos y la oxitocina inhibiría los procesos adaptativos en respuesta al alcohol. Debido a la implicación de esta transmisión oxitocinérgica, y por extensión, de los receptores de oxitocina en estos efectos, se ha propuesto que las neuronas oxitocinérgicas del SNC (principalmente localizadas en el cerebro basal y las estructuras límbicas) son elementos integrantes de la respuesta adaptativa del cerebro al alcohol. La respuesta adaptativa del SNC a la administración repetida de la droga da lugar a la tolerancia y a la dependencia física y psicológica. La activación de la neurotransmisión oxitocinérgica en estas circunstancias puede representar un mecanismo fisiológico de compensación importante, especialmente en la adaptación neuronal temprana y podría prevenir el rápido inicio de la tolerancia y dependencia a la droga (Kovacs *et al.*, 1998). Nuestros resultados muestran un claro efecto inhibitorio del etanol sobre la actividad oxitocinasa, que actuaría potenciando la función de la oxitocina.

Por lo que respecta a la vasopresina, es un neuropéptido que también participa en el desarrollo de tolerancia y o dependencia física al alcohol, probablemente relacionado también con los mecanismos de aprendizaje, aunque probablemente a través de estructuras diferentes a las implicadas en la memoria (Hoffman y Tabakoff, 1981). Se ha descrito que este efecto parece darse a través de su receptor V1 y tras la producción de segundos mensajeros (Briley *et al.*, 1994),

preferentemente en el septo y el hipocampo, pero no en la corteza cerebral. En esta zona estimula la transcripción del gen temprano *c-fos*, que parece jugar un papel importante en los procesos de neuroadaptación, y podría ser importante para la función de la vasopresina en la tolerancia al alcohol (Giri *et al.*, 1990). Nuestros resultados también apoyarían un efecto potenciado de este neuropéptido como consecuencia de la inhibición provocada por el alcohol sobre el enzima encargado de su degradación.

Estas observaciones son interesantes porque pueden dar luz a como un péptido endógeno puede modular las funciones del SNC actuando a través de sus propios receptores y modificando la eficacia de los sistemas neurotransmisores clásicos (p.e. dopamina). En general, los neuropéptidos endógenos y/o exógenos aparecen en el cerebro y los fluidos cerebrales durante unos pocos minutos. Sin embargo, sus efectos se detectan mucho tiempo después de su liberación. Por tanto, los neuropéptidos deben poner en escena varios procesos secundarios en el SNC que hagan viables todos estos cambios, probablemente a nivel molecular, induciendo cambios en la expresión génica. De hecho, se ha demostrado que la administración de alcohol y otras drogas de abuso induce cambios en la expresión génica tanto *in vitro* como *in vivo*, que serán, posiblemente, las responsables de la respuesta celular de la tolerancia y la dependencia (Mackler y Eberwine, 1991). Para nuestro conocimiento, no existe información acerca del efecto del alcohol sobre la expresión génica de las APs. También se ha descrito que el tratamiento crónico con alcohol reduce significativamente el número de neuronas que contienen vasopresina y otros péptidos (Madeira *et al.*, 1997), por lo que no se descarta que esta función de la vasopresina este influenciada o inflencie a otros sistemas neurotransmisores, como citábamos anteriormente.

Pero la actividad de los enzimas APA y APN es, además, importante en el sistema renina angiotensina (RAS, del inglés renin-angiotensin system). Este sistema se encarga del control a corto y largo plazo de la presión sanguínea a través de varias acciones directas e indirectas de la angiotensina II (Ang II) (Ganong, 1995). Además del RAS clásico, también se ha descrito un sistema renina angiotensina tisular (TRAS) (Ganong, 1994), que ha sido considerado como la posible ruta de síntesis de Ang II producida localmente en el cerebro (De Gasparo *et al.*, 1994; Sim *et al.*, 1994). Además, la Ang II es hidrolizada por la APA, separando el aminoácido aspártico amino-terminal, y dando lugar a la angiotensina III (Ang III) que también posee actividad biológica, especialmente en el cerebro. A continuación, sobre la Ang III pueden actuar otras aminopeptidasas (las anteriormente citadas APN para separar la arginina amino-terminal (Kugler, 1982)

y dar lugar a la angiotensina IV (Ang IV), que también ha demostrado poseer actividad biológica (Wright y Harding, 1995). Un efecto importante del alcohol es su capacidad de provocar hipertensión, y el sistema nervioso es especialmente sensible a la hipertensión, dando lugar a una gran variedad de cambios celulares y vasculares (Amenta *et al.*, 1996). Se ha propuesto que uno de los mecanismos que contribuyen a la hipertensión en los alcohólicos es la modificación del RAS (Brecher *et al.*, 1996). En este sentido, Thevananther y Brecher (Thevananther y Brecher, 1994) han sugerido que un posible factor puede ser la interacción con el metabolito acetaldehído, que provoca un incremento en la velocidad de síntesis de la Ang I. También se ha sugerido que podría existir una disminución de la velocidad de degradación de la Ang II por sus enzimas degradativos. Así, se ha demostrado que el acetaldehído inhibe la actividad APA (Brecher *et al.*, 1996). Trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio confirman este hecho, pues la presencia de alcohol en el medio de incubación inhibe tanto la actividad glutamato aminopeptidasa como aspartato aminopeptidasa de sinaptosomas corticales de ratón (Mayas *et al.*, 2000). También se ha descrito que el acetaldehído inhibe la APN, potenciándose paralelamente el efecto presor de la Ang III (Brecher *et al.*, 1996), la cual es especialmente activa en el cerebro (De Gasparo *et al.*, 1994). Nuestros resultados confirman nuevamente esta hipótesis, al obtenerse un claro efecto inhibitor del alcohol sobre las actividades APA y APN. Por tanto, es lógico pensar que las limitaciones en la inactivación de la Ang II/Ang III por las distintas aminopeptidasas presentes en el tejido nervioso como consecuencia del efecto del alcohol (bien directamente, bien a través de su metabolito acetaldehído) pueden tener un papel importante en promover los incrementos de la presión sanguínea encontrada en los individuos alcohólicos, especialmente a nivel local del cerebro.

Finalmente, el efecto inhibitor del alcohol sobre la actividad pGluAP encontrado en el presente estudio, provocaría un incremento en los niveles de TRH corticales, potenciando el efecto modulador endógeno de diferentes parámetros bioquímicos y comportamentales relacionados con el consumo de etanol. De hecho, se ha descrito que la inyección intracerebroventricular de TRH cambia muchas respuestas comportamentales en rata. Así, incrementa la locomoción, el agitamiento del cuerpo, el rascado o la piloerección, y disminuye el olfateo y los periodos de descanso. Este incremento en los niveles de TRH, propuesto como consecuencia de la inhibición por alcohol de la pGluAP, podría ser responsable, por tanto, de la actitud desinhibida y eufórica característica de los individuos que ingieren alcohol. Esto se ve apoyado porque la corteza cerebral muestra un potente efecto inhibitor de los efectos de la TRH, como se ha demostrado en experimentos de ablación de

la corteza cerebral (Katsuura *et al.*, 1984). Además, el incremento en los niveles de TRH origina también la liberación de noradrenalina (Itoh *et al.*, 1994), contribuyendo también a la acción euforizante del etanol. Por último, citar que también se ha demostrado que la cocaína incrementa los niveles de TRH en diferentes zonas cerebrales (Jaworska *et al.*, 1997), de modo que este neuropéptido podría estar implicado en los fenómenos de dependencia *in vivo*. En cualquier caso, también hay que tener en cuenta que existen otros péptidos susceptibles de ser hidrolizados por la pGluAP. Así, se ha descrito que la administración intracerebral de péptidos relacionados con la pGluAP (neurotensina y bombesina) a ratones provoca un incremento en la duración del sueño provocado por la ingesta de etanol, e incluso resaltan la hipotermia provocada por la ingesta de alcohol (Luttinger *et al.*, 1983).

En conclusión, las modificaciones de las distintas actividades aminopeptidasas analizadas en neuronas y células astrogiales inducidas por el alcohol, reflejan el hecho de que el alcohol puede modular el funcionamiento de diversos neuropéptidos y péptidos activos que actúan en el SNC, a través de los enzimas encargados de su degradación, probablemente como un resultado más de las complejas interacciones del alcohol con las diversas funciones del sistema nervioso.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- Abraham MH, Lieb WR, Franks NP. Role of hydrogen bonding in general anesthesia. *J Pharmacol Sci* 1991; 80: 719-724.
- Adams KM, Gilman S, Koeppe RA, Klun KJ, Brunberg JA, Dede D, Berent S, Kroll PD. Neuropsychological deficits are correlated with frontal hypometabolism in positron emission tomography studies of older alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 42: 631-639.
- Aguayo LG. Ethanol potentiates the GABAA-activated Cl⁻ current in mouse hippocampal and cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 1990; 187: 127-130.
- Allan AM, Harris RA. Acute and chronic ethanol treatment alter GABA receptor operated chloride channels. *Pharmac Biochem Behav* 1987; 27: 665-670.
- Alling C, Bostrom K. Demyelination of the mammillary bodies in alcoholism, a combined morphological and biochemical study. *Acta Neuropathol* 1980; 50: 77-80.
- Amenta F, Stocchi P, Sabbatini M. Vascular and neuronal hypertension brain damage: A protective effect of treatment with nicardipine. *J Hypertens-Suppl* 1996; 14: S29-35.
- Aracava Y, Fróes-Ferrão MM, Pereira EFR, Albuquerque EX. Sensitivity of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and nicotinic acetylcholine receptors to ethanol and pyrazole. *Ann NY Acad Sci* 1991; 625: 451-472.
- Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, para lysis agitans, and Korsakoff's disease. *Acta Neuropathol* 1983; 61: 101-108.
- Ashton H. Brain systems, disorders and psychotropic drugs. Oxford University Press 1993.
- Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press; 1998.
- Barry JA, Gawrish K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1994; 33: 8082-8088.

- Bartus RT, Fleming D, Johnson HR. Aging in the rhesus monkey, debilitating effects on short-term memory. *J Geront* 1978; 33: 858-871.
- Berg MJ, Marks N. Formation of des-tyr-dynorphins 5-17 by a purified cytosolic aminopeptidase of rat brain. *J Neurosci Res* 1989; 11:313-321.
- Bergman H, Borg S, Hindmarsh T, Idestrom CM, Mutzell S. Computed tomography of the brain and neuropsychological assesment of male alcoholic patients and a random sample from the general male population. *Acta Psychiatr Scand* 1980; 62: 77-88.
- Bhave SV, Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol sensitivity of NMDA receptor function in developing cerebelar granule neurons: relationship to NMDA receptor subunit expression. *Eur J Pharmacol* 1999; 369: 247-259.
- Bjorklund A, Lindvall O. Dopamine-containing systems in the CNS. En: *Handbook of chemical neuroanatomy: classical neurotransmitters in the CNS*. Bjorklund A, Hokfelt T (eds). Amsterdam, Elsevier Science 1984; 55-122.
- Blass J.P., Gibson G.E. Abnormality of thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome. *N Engl J Med* 1977; 297: 1367-70.
- Blum K, Briggs AH, Trachtenberg MC. Ethanol ingestive behaviour as a function of central neurotransmission. *Experientia* 1989; 45: 444-452.
- Bowden SC. Separating cognitive impairment in neurologically asymptomatic alcoholism from Wernicke-Korsakoff syndrome: is the neuropsychological distinction justified?. *Psychol Bull* 1990; 107: 355-366.
- Bowman WC, Rand MJ. *Textbook of pharmacology*. Londres, Blackwell Scientific Publications 1980.
- Bradley PB, Engel G, Fenink W, Fozard JR, Humphrey PPA, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5HT. *Neuropharmacology* 1986; 25: 563-576.
- Brecher AS, Stauffer R, Knight J. Acetaldehyde inhibits serum aminopeptidases. *Alcohol* 1996; 13: 125-131.
- Briley EM, Lolait SJ, Axelrod J, Felder CC. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides* 1994; 27: 63-74.
- Broadbent J., Grahame N.J., Cunningham C.L. Haloperidol prevents ethanol-stimulated locomotor activity but fails to block sensitization. *Psychopharmacology* 1995; 120: 475-482.
- Brozoski T, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 1979; 205: 929-931.
- Buckholtz NS, Zhou DF, Tabakoff B. Ethanol does not affect serotonin receptor binding in rodent brain. *Alcohol* 1989; 6: 227-280.
- Burov Iu V, Iukhananov R Iu, Maiskii AI. Effect of ethanol on the concentration of enkephalins in the brain of rats with different levels of alcoholic motivation. *Biull Eksp Biol Med* 1983; 96: 48-51.
- Butterworth R.F., Kril J.J., Harper C.G. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: Relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 1084-1088.
- Butterworth RF. Pathophysiology of alcoholic brain damage synergistic effects of ethanol, thiamine deficiency and alcoholic liver disease. *Metab Brain Dis* 1995; 10: 1-8.
- Cala LA, Jones B, Mastaglia FL, Wiley B. Brain atrophy and intellectual impairment in heavy drinkers, a clinical psychometric and computerized tomographic study. *Aust NZ J Med* 1978; 8: 147-153.
- Carboni E, Acquis E, Frau R, Di Chiara G. Differential inhibitory effects of a 5-HT3 antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol* 1989; 164: 515-519.
- Carlen PL, Wilkinson DA. Reversibility of alcohol-related brain damage: Clinical and experimental observations. *Acta Med Scand*. 1987; 222: 19-26.
- Carlen PL, Wilkinson DA, Wortzman G, Holgate R, Cordingley J, Lee MA, Huszar L, Moddel G, Singh R, Kiraly L, Rankin JG. Cerebral atrophy and functional deficits in alcoholics without clinically apparent liver disease. *Neurology* 1981; 31: 377-385.
- Carlsson A, Lindqvist M. Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J Pharm Pharmacol* 1973; 25: 437-440.

- Carlsson A, Adolfsson R, Aquilonius SM, Gottfries CG, Oreland L, Svennerholm L, Winblad B. Biogenic amines in human brain in normal aging, senile dementia and chronic alcoholism. En: Ergot compounds and brain function. Neuroendocrine and neuropsychiatric aspects. Goldstein M, Liebermann A, Calne DB, Thorner MO (eds). New York; Raven Press 1980; 295-304.
- Carlsson A. Perspectives on the discovery of monoaminergic neurotransmission. *Ann Rev Neurosci* 1987; 10: 19-40.
- Carvey PM. Drug action in the CNS. New York, Oxford University Press 1998.
- Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: Evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 1994; 14: 3106-3121.
- Celentano JJ, Gibbs TT, Farb DH. Ethanol potentiates GABA- and glycine-induced chloride currents in chick spinal cord neurons. *Brain Res* 1988; 455: 377-380.
- Charness M.E. Direct effects of ethanol on signalling proteins. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20: 157-161.
- Checler F. Neuropeptide-degrading peptidases. En: Parvaez SH, Naoi M., Nagatsu, T., Parvaez S. Eds. *Methods in Neuropeptide Research*. Amsterdam : Elsevier ; 1993. p. 375-418.
- Chin JH, Goldstein DB. Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. *Mol Pharmacol* 1981; 19: 425-431.
- Chiou SJ, Ma SM, Kamaya H, Ueda I. Anesthesia cutoff phenomenon: interfacial hydrogen bonding. *Science* 1990; 248: 583-585.
- Clark, W.D. Alcoholism: block to diagnosis and treatment. *Am J Med* 1981; 71: 275-286.
- Clark AJ. *Applied Pharmacology*. Londres, J & A Churchill Ltd. 1942.
- Coffey J.W., de Duve C. Digestive activity of lysosomes. *J Biol Chem.* 1968; 243: 3255-3263.
- Collins MA. A possible neurochemical mechanism for brain and nerve damage associated with chronic alcoholism. *Trends Pharmac Sci* 1982; 3: 373-375.
- Collins MA, Corso TD, Neafsey EJ. Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 284-292.
- Costall B, Naylor RJ, Tyers MB. The psychopharmacology of 5-HT₃ receptors. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 181-202.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-695.
- Crossland J. *Lewis' Pharmacology*. Londres, Churchill Livingstone 1980.
- Cullen KM, Halliday GM. Mechanisms of cell death in cholinergic basal forebrain neurons in chronic alcoholics. *Met Brain Dis* 1995; 10: 81-91.
- Davila MD, Shear PK, Lane B, Sullivan EV, Pfefferbaum A. A mammillary body and cerebellar shrinkage in chronic alcoholics: an MRI and neuropsychological study. *Neuropsychology* 1994; 8: 433-444.
- De Gasparo M, Botton S, Levens NR. Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology. En: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. New York: Ed. Raven Press; 1994. p.101-119.
- De la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol* 1988; 45: 990-992.
- Deitrich RA, Dunwiddie TV, Harris RA, Erwin VG. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmac Rev* 1989; 41: 489-537.
- Diamond I, Gordon AS. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 1997; 77: 1-20.
- Diana M, Pistis M, Muntoni A, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL. Profound decrement of dopaminergic activity during alcohol withdrawal: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7966-7969.
- Dickinson R, Franks NP, Lieb WR. Thermodynamics of anesthetic/protein interaction. Temperature studies on firefly luciferase. *Biophys J* 1993; 64: 1254-1271.
- Dildy-Mayfield JE, Leslie SW. Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in free intracellular Ca²⁺ concentration by ethanol. *J Neurochem* 1991; 56: 1536-1543.

- Dildy-Mayfield JE, Harris RA. Activation of protein kinase C inhibits kainate-induced currents in oocytes expressing glutamate receptor subunits. *J Neurochem* 1994; 62: 1639-1642.
- Dildy-Mayfield JE, Harris RA. Ethanol inhibits kainate responses of glutamate receptors expressed in *Xenopus* oocytes: role of calcium and protein kinase C. *J Neurosci* 1995; 15: 3162-3171.
- Dildy-Mayfield J.E, Leslie S.W. Ethanol inhibit NMDA-induced increases in free intracellular calcium in dissociated brain cells. *Brain Res* 1989; 499: 383-387.
- Dolan RJ, Fletcher P, Frith CD, Friston KJ, Frackowiak RS, Crasby PM. Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Nature* 1995; 378: 180-182.
- Eckardt MJ, File SF, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol clin Exp Res* 1998; 22: 998-1040.
- Eckardt MJ, Stapleton JM, Rawlings RR, Davis EZ, Grodin DM. Neuropsychological functioning in detoxified alcoholics between 18 and 35 years of age. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 53-59.
- Eckardt MJ, File S, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22:998-1040.
- Edmondson HA, Hall EM, Myers RD. Pathology of alcoholism. En: *Alcoholism*. Thompson GN (ed). Springfield, Charles C Thomas 1956; 233-290.
- Eyring H, Woodbury JW, Dárrigo JS. A molecular mechanism of general anesthesia. *Anesthesiology* 1973; 38: 415-424.
- Fadda F, Garau B, Marchei F, Colombo G, Gessa GL. MDL 72222, a selective 5-HT₃ receptor antagonist, supresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 1991b; 26: 107-110.
- Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 385-431.
- Felgenhauer K., Glenner GG. The enzymatic hydrolysis of aminoacid beta-naphthylamidases. II. Partial purification and properties of a peptide-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. *J Histochem Cytochem* 1966; 14: 401-413.
- Fink K, Schultheiss R, Göthert M. Inhibition of N-methyl-D-aspartate- and kainate-evoked noradrenaline release in human cerebral cortex slices by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 345: 700-703.
- Forman SA, Miller KW, Yellen G. A discrete site for general-anaesthetics on a postsynaptic receptor. *Mol Pharmac* 1995; 48: 574-581.
- Franks NP, Lieb WR. Sterespecific effects of inhalation general anesthetic optical isomers on nerve ion channels. *Science* 1991; 254: 427-430.
- Franks NP, Lieb WR. Molecular mechanism of general anesthesia. *Nature* 1982; 300: 487-493.
- Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general-anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-614.
- Freund G. Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Ann Rev Pharmac* 1973; 13: 217-227.
- Freund G, Ballinger WE. Loss of muscarinic and benzodiazepine neuroreceptors from hippocampus of alcohol abusers. *Alcohol* 1989; 6: 23-21.
- Froehlich JC, Li TK. Opioid involvement in alcohol drinking. *Ann NY Acad Sci* 1994; 739: 156-167.
- Frommel E, Seydoux J. De l'effet de l'éthanol sur l'encéphale. Bilan des tests dits de neuropharmacologie chez l'animal. *Helv Physiol Acta* 1964; 22: 34.
- Gaddum JH. *Pharmacology*. Londres, Oxford University Press 1959.
- Ganong WF. Tissue renin-angiotensin system. *Adv Exp Med Biol* 1995; 377: 435-440.
- Ganong WF. What regulates the production and secretion of angiotensinogen in the brain? *Front Neuroendocrinol* 1994; 15: 78-81.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Brain Res* 1985; 248: 210-214.
- Gianoulakis C, Gupta A. Endorphins in inbred mice with variable sensitivity to ethanol: effect of acute ethanol treatment. *Neuropeptides* 1985; 5: 579-582.

- Gilman S, Adams K, Koeppe RA, Berent S, Kluin KJ, Modell JG, Kroll P, Brunberg JA. Cerebellar and frontal hypometabolism in alcoholic cerebellar degeneration studied with positron emission tomography. *Ann Neurol* 1990; 28: 775-785.
- Giri PR, Dave JR, Tabakoff B, Hoffman PL. Arginine vasopressin induces the expression of c-fos in the mouse septum and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1990; 7: 131-137.
- Givens BS, Breese GR. Site-specific enhancement of γ -aminobutyric acid-mediated inhibition of neural activity by ethanol in the rat medial septal area. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 528-538.
- Goldman-Rakic PS, Brown RM. Regional changes of monoamines in cerebral cortex and subcortical structures of aging rhesus monkeys. *Neuroscience* 1981; 6: 177-187.
- Goldman-Rakic PS. Circuitry of the prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational knowledge. En: *Handbook of physiology: The nervous system: higher cortical function*. Mountcastle VB, Plum F (eds). Bethesda, American Physiological Society 1987; 373-417.
- Gonzales RA, Woodward JJ. Ethanol inhibits N-methyl-D-aspartate-stimulated [3 H]norepinephrine release from rat cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 1138-1144.
- Gonzales RA, Hoffman PL. Receptor gated channels may be selective CNS targets for ethanol. *Trends in Pharmac Sci* 1991; 12: 1-3.
- Göthert M, Fink K. Inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and L-glutamate-induced noradrenaline and acetylcholine release in the rat brain by ethanol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 340: 516-521.
- Grant KA. Emerging neurochemical concepts in the actions of ethanol at ligand-gated ion channels. *Behav Pharmacol* 1994; 5: 383-404.
- Grant KA, Hoffman PL, Tabakoff B. Neurobiological and behavioral approaches to tolerance and dependence. En: *The nature of drug dependence*. Edwards G, Lader M (eds). Oxford, Oxford University Press 1990a; 135-169.
- Grant KA, Valverius P, Hudspeth M, Tabakoff B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 1990b; 176: 289-296.
- Grollman A, Grollman EF. *Pharmacology and Therapeutics*. Philadelphia, Lea & Febiger 1970.
- Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991; 547: 129-134.
- Hakim AM, Pappius HM. Sequence of metabolic, clinical, and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann Neurol* 1983; 13: 365-375.
- Hakim AM. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann Neurol* 1984; 16: 673-679.
- Halliday G, Cullen K, Harding A. Neuropathological correlates of memory dysfunction in the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol* 1994; 2: 247-253.
- Harding AJ, Halliday GM, Ng JLF, Harper CG, Kril JJ. Loss of vasopressin-immunoreactive neurons in alcoholics is dose-related and time-dependent. *Neuroscience* 1996; 72: 699-708.
- Harper CG. The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia. A neuropathological study of 131 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46: 593-98.
- Harding AJ, Baker KG, Harper CG, Kril JJ, Halliday GM. Cerebellar neuron loss in alcoholics. 18th Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society. Canberra 1998.
- Harper CG, Kril JJ. Corpus callosum thickness in alcoholics. *Brit J Addict* 1988; 83: 577-580.
- Harper CG, Blumberg PC. Brain weights in alcoholics. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1982; 45: 593-598.
- Harper CG, Butterworth R. Nutritional and metabolic disorders. En: *Greenfield's neuropathology*. Graham DI, Lantos PL (ed). London, Arnold 1997; 601-642.
- Harper CG, Kril JJ. Brain atrophy in chronic alcoholic patients: A quantitative pathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 211-217.
- Harper CG, Kril JJ, Holloway RL. Brain shrinkage in chronic alcoholics. A pathological study. *Br Med J* 1985; 290: 501-504.
- Hata T, Meyer JS, Tanahashi N, Ishikawa Y, Imai A,

- Shinohara T, Velez M, Fann WE, Kandula P, Sakai F. Three-dimensional mapping of local cerebral perfusion in alcoholic encephalopathy with and without Wernicke-Korsakoff syndrome. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 35-44.
- Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem* 1989; 52: 1937-1940.
- Hersh LB. Characterization of membrane bound aminopeptidases from rat brain: identification of the enkephalin-degrading aminopeptidase. *J Neurochem* 1985; 44:1427-1435.
- Hoffman PL, Tabakoff B. Centrally acting peptides and tolerance to ethanol. *Curr Alcohol* 1981; 8: 359-378.
- Hunter R, McLuskie R, Wyper D, Patterson J, Christie JE, Brooks DN, McCulloch, J, Fink G, Goodwin GM. The pattern of function-related regional cerebral blood flow investigated by single photon emission tomography with ^{99m}Tc-HMPAO in patients with presenile Alzheimer's disease and Korsakoff's psychosis. *Psychol Med* 1989; 19: 847-855.
- Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 219-239.
- Itoh C, Nagamatsu A. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243:203-208.
- Itoh Y, Ogasawara T, Yamazaki A, Ukai Y, Miura A, Kimura K. Enhancement of noradrenaline release from rat frontal cortex by thyrotropin releasing hormone and its analog (3R, 6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinylcarbonyl-L-histidyl-L-prolinamide, as studied by intracerebral microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 255-261.
- Iwata H. Possible role of thiamine in the nervous system. *Trends Pharmac Sci* 1982; 3: 171-173.
- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 267-273.
- Jacobson RR, Lishman WA. Cortical and diencephalic lesions in Korsakoff's syndrome, a clinical and CT scan study. *Psychol Med* 1990; 20: 63-75.
- Jernigan TL, Butters N, Di Triaglia G, Schafer K, Smith T, Irwin M, Grant L, Schuckit M, Cermak LS. Reduced cerebral grey matter observed in alcoholics using magnetic resonance imaging. *Alcohol Clin Exp Res* 1991a; 15: 418-427.
- Jacobson RR, Acker CF, Lishman WA. Patterns of neuropsychological deficit in alcoholic Korsakoff's syndrome. *Psychol Med* 1990; 20: 321-334.
- Jaworska-Feil L, Budziszewska B, Lason W. Effects of repeated cocaine administration on the thyrotropin releasing hormone level and receptors in the rat brain. *Neuropeptides* 1997; 31: 253-258.
- Jernigan TL, Schafer K, Butters N. Magnetic resonance imaging of alcoholic Korsakoff patients. *Neuropsychopharmacology* 1991b; 4: 175-186.
- Kalivas PW, Samson HH. The neurobiology of drug and alcohol addiction. *Ann NY Acad Sci* 1992; 654.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de neurociencia*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana 2001.
- Kania R.K., Santiago NA.; Gray GM. Intestinal surface amino-oligopeptidases. II. Substrate kinetics and topography of the active site. *J Biol Chem* 1977; 252: 4929-4934.
- Katsuura G, Yoshikawa K, Itoh S, Hsiao S. Behavioral effects of thyrotropin releasing hormone in frontal decorticated rats. *Peptides* 1984; 5: 899-903.
- Kilpatrick GJ, Jones BJ, Tyers MB. Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 1987; 330: 1746-748.
- Kiyatkin EA. Functional significance of mesolimbic dopamine. *Neurosci Behav Rev* 1995; 19: 573-598.
- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmac Sci* 1992; 13: 177-184.
- Kostowski W, Dyr W, Krzascik P. The abilities of 5-HT₃ receptor antagonist ICS 205-930 to inhibit alcohol preference and withdrawal seizures in rats. *Alcohol* 1993; 10: 369-373.
- Kovács GL, Sarnyai Z, Szabó G. Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23: 945-962.
- Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 1997; 79: 983-998.

- Krill JJ, Harper CG. Neuronal counts from four cortical regions of alcoholic brains. *Acta Neuropathol* 1989; 41: 67-80.
- Krill JJ. Neuropathology of thiamine deficiency disorders. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 9-17.
- Kugler P. On angiotensin-degrading aminopeptidases in the rat kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982; 76: 1-86.
- Langalis PJ, Zhang SX, Savage LM. Neuropathology of thiamine deficiency, an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis* 1996; 11: 19-37.
- Langalis PJ, Zhang SX. Extracellular glutamate is increased in thalamus during thiamine deficiency-induced lesions and is blocked by MK-801. *J Neurochem* 1993; 61: 2175-2182.
- Li C, Peoples RW, Weight FF. Alcohol action on a neuronal membrane receptor: evidence for a direct interaction with the receptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8200-8204.
- Lima-Landman MT, Albuquerque EX. Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett* 1989; 247: 61-67.
- Lindboe C, Loberg E. The frequency of WKS in alcoholics, a comparison between the 5 year periods 1975-1979 and 1983-1987. *J Neurol Sci* 1989; 88: 107-113.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino-acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330: 613-622.
- Litter M. *Farmacología experimental clínica*. Buenos Aires, El Ateneo 1988.
- Little HJ. Mechanisms that may underlie the behavioral effect of ethanol. *Prog Neurobiol* 1991; 36: 171-194.
- Littleton J, Little HJ. Current concepts of ethanol dependence. *Addiction* 1994; 89: 1397-1412.
- Lovinger DM. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 267-282.
- Lovinger DM. Developmental decrease in ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rat neocortical neurons: Relation in the actions of ifenprodil. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 164-172.
- Lovinger DM. Ethanol potentiation of 5-HT3 receptor-mediated ion current in NCB-20 neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 1991; 122: 57-60.
- Lovinger DM. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 19-27.
- Lovinger DM, White G. Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine3 receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 263-270.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 1989; 243: 1721-1724.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci* 1990; 10: 1372-1379.
- Luttinger D, Frye GD, Nemeroff CB, Prange AJ Jr. The effects of neurotensin, beta-endorphin, and bombesin on ethanol-induced behaviors in mice. *Psychopharmacology-Berl*. 1983; 79(4): 257-63.
- Mackler SA, Eberwine JH. The molecular biology of addictive drugs. *Mol Neurobiol* 1991; 5: 45-58.
- Madeira MD, Andrade JP, Lieberman AR, Sousa N, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Chronic alcohol consumption and withdrawal do not induce cell death in the suprachiasmatic nucleus, but lead to irreversible depression of peptide immunoreactivity and mRNA levels. *J Neurosci* 1997; 17: 1302-1319.
- Markowitsch HJ. Diencephale amnesia, a reorientation towards tracts?. *Brain Des Rev* 1988; 13: 351-370.
- Massarelli R. Effect of ethanol on the cholinergic system. En: *Biochemistry and pharmacology ethanol*. Majchrowicz E, Noble EP (eds). New York, Plenum Press 1979; 223-240.
- Mayas MD, Martínez-Martos JM, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M. Influencia del alcohol etílico sobre la actividad aminopeptidasa A de sinaptosomas corticales de ratón. *Arch Neurocienc* 2000; 5: 120-126.
- Mayas MD, Martínez Martos JM, Ramírez Expósito MJ, García MJ, Tsuboyama GK, Prieto I, Arechaga G, Ramírez M. Estudio in vitro del efecto del etanol sobre la actividad piroglutamato aminopeptidasa en sinaptosomas de ratón en condiciones basales y

- despolarizantes. *Rev Neurol* 2000; 30:128-131.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Tsuboyama GK, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Calcium-dependent modulation by ethanol of mouse synaptosomal pyroglutamyl aminopeptidase activity under basal and K⁺-stimulated conditions. *Neurosci Lett* 2000; 293: 199-202.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Influencia del alcohol sobre las aminopeptidasas cerebrales. Un estudio in vitro. *Rev Neurol* 2001; 32: 1031-1040.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Ramírez M, Martínez-Martos JM. Ethanol modifies differently aspartyl- and glutamyl- aminopeptidase activities in mouse frontal cortex synaptosomes. *Brain Res Bull* 2002; 57: 195-203.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Carrera MP, Martínez-Martos JM. Effects of chronic ethanol intake on pyroglutamyl aminopeptidase activity in mouse brain synaptosomes. *Arch Neurosci* 2003; 1: 4-7.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Carrera MP, Martínez-Martos JM. Ethanol modulates neuropeptide-degrading aminopeptidases at the synapse level in calcium-dependent conditions. *Alcohol Alcoholism* 2004; 39: 393-405.
- Mayas MD, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Carrera MP, Cobo M, Camacho B, Martínez-Martos JM. Chronic ethanol intake modifies renin-angiotensin system-regulating aminopeptidase activities in mouse cerebellum. *Neuropeptides* 2005; 39: 67-72.
- Mayes AR, Meudell PR, Mann D, Pickering A. Locations of the lesions in Korsakoff's syndrome. Neurophatological data on two patients. *Cortex* 1988; 24: 367-388.
- McDonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17: 569-602.
- McDonald JK, Barret AJ. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. Vol. 2. London: Academic Press; 1996.
- McMullen PA, Saint-Cyr JA, Carlen PL. Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting chronic ethanol consumption and withdrawal. *J Comp Neurol* 1984; 225: 111-118.
- Mechoulam R. Cannabinoids as therapeutic agents. Boca Raton, CRC Press 1986.
- Mehta AK, Ticku MK. Ethanol potentiation of GABAergic transmission in cultured spinal cord neurons involves γ -aminobutyric acid A-gated chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 558-564.
- Melgaard B, Henriksen L, Ahlgren P, Danielsen UT, Sorensen H, Paulson OB. Regional cerebral blood flow in chronic alcoholics measured by single photon emission computerized tomography. *Acta Neurol Scand* 1990; 82: 87-93.
- Mereu G, Fadda F, Gessa GL. Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unaesthetized rats. *Brain Res* 1984; 292: 63-69.
- Meyers FH, Jawetz E, Goldfien A. Manual de farmacología clínica. México, El Manual Moderno SA 1981.
- Mihic SJ, Wu PH, Kalant H. Potentiation of γ -aminobutyric acid-mediated chloride flux by pentobarbital and diazepam but not ethanol. *J Neurochem* 1992; 58: 745-751.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABAA and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-389.
- Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1219-1237.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-389.
- Mucha RF, Pinel JPL. Increased susceptibility to kindled seizures in rats following a single injection of alcohol. *J Stud Alcohol* 1979; 40: 258-271.
- Mukherjee A.B., Svoronos S., Ghazanfari A., Martin P.R. Transketolase abnormality in cultured fibroblast from familial chronic alcoholic men and their male offspring. *J Clin Invest* 1987; 79: 1039-43.
- Nasrallah HA, Andreasen NC, Coffman JA, Olson SC, Dunn VD, Ehrhardt JC, Chapman SM. A controlled magnetic resonance imaging study of corpus callosum thickness in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1986; 21: 274-282.
- Nelson BK, Brightwell WS, MacKenzie-Taylor DR,

- Burg JR, Massari VJ. Neurochemical, but not behavioural, deviations in the offspring of rats following prenatal or paternal inhalation exposure to ethanol. *Neurotoxicol Teratol* 1988; 10: 15-22.
- Nestoros JN. Ethanol specifically potentiates GABA-mediated neurotransmission in feline cerebral cortex. *Science* 1980; 209: 708-710.
- Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 1995; 26: 305-336.
- Nishio M, Narahashi T. Ethanol enhancement of GABA-activated chloride current in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1990; 518: 283-286.
- Nordberg A, Larsson C, Perdahl E, Winblad B. Changes in cholinergic activity in human hippocampus following chronic alcohol abuse. *Pharmac Biochem Behav* 1983; 18: 397-400.
- Nutt DJ, Glue P. Neuropharmacological and clinical aspects of alcohol withdrawal. *Ann Med* 1990; 22: 275-281.
- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 1997; 385: 634-636.
- Osmanovic SS, Shefner SA. Enhancement of current induced by superfusion of GABA in locus coeruleus neurons by pentobarbital, but not ethanol. *Brain Res* 1990; 517: 324-329.
- Peoples RW, Weight FF. Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2825-2829.
- Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptors. *J Neurochem* 1993; 60: 408-416.
- Pfefferbaum A, Lim KO, Zipursky RB, Mathalon DH, Rosenbloom MJ, Lane B, Ha CN, Sullivan EV. Brain gray and white matter volume loss accelerates with aging in chronic alcoholics. A quantitative MRI study. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 1078-1089.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom M. In vivo imaging of morphological brain alterations associated with alcoholism. In: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (eds). Rockville: US Department of Health and Human Services 1993; 71-87.
- Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Shear PK, Rosenbloom MJ, Lim KO. Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1177-1191.
- Phillips SC, Harper CG, Kril JA. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain* 1987; 110: 301-314.
- Phillips SC, Harper CG, Kril JA. The contribution of Wernicke's encephalopathy to alcohol-related cerebellar damage. *Aust Drug Alcohol Rev* 1990; 9: 53-60.
- Pohorecky LA. Brain catecholamines and ethanol: involvement in physical dependence and withdrawal. *Adv Exp Med Biol* 1977; 85: 495-513.
- Pratt J. *The biological bases of drug tolerance and dependence*. London, Academic Press 1991.
- Press GA, Amaral DG, Squire LR. Hippocampal abnormalities in amnesic patients revealed by high-resolution magnetic resonance imaging. *Nature* 1989; 341: 54-57.
- Prewlocka B, Lason W. Stress prevents the chronic ethanol-induced delta opioid receptor supersensitivity in the rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm* 1990; 42: 137-142.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers B, Ymer S, Kettenmann H, Shofield PR, Seeburg PH. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989; 338: 582-585.
- Przewlocka B, Lason W. The effect of single and repeated ethanol administration on hypothalamic opioid systems activity -- an in vitro release study. *Drug Alcohol Depend* 1991; 27: 63-67.
- Rabe CS, Tabakoff B. Glycine site-directed agonist reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 753-757.
- Reynolds JN, Prasad A. Ethanol enhances GABAA receptor-activated chloride currents in chick cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1991; 564: 138-142.
- Ron MA. *The alcoholic brain, CT scan and psychological findings*. Psychological medicine monograph supplement 3. Cambridge, University Press 1983.
- Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in

- the rat striatum. *Eur J Pharmac* 1995; 283: 177-183.
- Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Esteban V., Suzuki Y., Mezano S. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001; 1382-1387.
- Sachs H, Russell JAG, Christmas DR, Cook B. Alteration of regional cerebral glucose metabolic rate in non-korsakoff chronic alcoholism. *Arch Neurol* 1987; 44: 1242-1251.
- Samson Y, Baron JC, Feline A, Bories J, Crouzel C. Local cerebral glucose utilization in chronic alcoholics, a positron tomographic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1986; 49: 1165-1170.
- Samson HH, Hodge CW. Neurobehavioral regulation of ethanol intake. En: *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Deitrich RA, Erwin VG (eds). USA, Boca Raton CRC Press 1996; 203-226.
- Samson HH, Harris RA. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmac Sci* 1992; 13: 206-211.
- Sánchez-Amate MC, Carrasco MP, Zurera JM, Segovia JL, Marco C. Persistence of the effects of ethanol in vitro on the lipid order and enzyme activities of chick-liver membranes. *Eur J Pharmacol* 1995; 292: 215-221.
- Sánchez-Amate MC, Marco C, Segovia JL. Comparative study of the effect of ethanol on the fluidity of subcellular hepatic membranes. *Biochem Int* 1992; 27: 535-543.
- Saper CB. Memory: anatomical organization of candidate brain regions. En: *The nervous system, handbook of physiology*. Mountcastle VB, Plum F, Geiger SR (eds). Baltimore, Williams & Wilkins 1987; 169-210.
- Seixas FA, Eggleston S. Alcoholism and the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1973; 215: 1-389.
- Schnebli HP, Phillipps MA, Barclay RK. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1979; 569:87-98.
- Seixas FA, Eggleston S. Work in progress on alcoholism. *Ann NY Acad Sci* 1976; 273: 1-664.
- Shear PK, Jernigan TL, Butters N. Volumetric magnetic resonance imaging quantification of longitudinal brain changes in abstinent alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 172-176.
- Shanley BC, Wilce PA. Receptor changes associated with ethanol-induced brain damage. En: *Alcohol-induced brain damage*. Hunt WA, Nixon SJ (ed). Rockville: U.S Department of health and human services. 1993; 299-324.
- Shen R.Y., Hannigan J.H., Chiodo L.A. The effects of chronic amphetamine treatment on prenatal ethanol-induced changes in dopamine receptor function: electrophysiological findings. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1995; 274: 1054-1060.
- Shimamura M, Hazato T, Iwaguchi T. A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction: hydrolysis of enkephalin. *Brain Res* 1988; 445: 350-353.
- Sim MK, Choo MH, Qui XS. Degradation of angiotensin I to [des-Asp₁]angiotensin I by a novel aminopeptidase in the rat. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1043-1046.
- Simson PE, Criswell HE, Johnson KB, Hicks RE, Breese GR. Ethanol inhibits NMDA-evoked electrophysiological activity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1991b; 257: 225-231.
- Simson PE, Criswell HE, Breese GR. Ethanol potentiates γ -aminobutyric acid-mediated inhibition in the inferior colliculus: Evidence for local ethanol/ γ -aminobutyric acid interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 1991a; 259: 1288-1293.
- Smith PB. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 219-227.
- Snell LD, Iorio KR, Tabakoff B, Hoffman PL. Protein kinase C activation attenuates N-methyl-D-aspartate-induced increases in intracellular calcium in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1994a; 62: 1783-1789.
- Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Involvement of protein kinase C in ethanol-induced inhibition of NMDA receptor function in cerebellar granule cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1994b; 18: 81-85.
- Squire LR, Amaral DG, Press GA. Magnetic resonance imaging of the hippocampal and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *J Neur* 1990; 10: 3106-3117.
- Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A. Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 110-122.

- Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A. Relationship between alcohol withdrawal seizures and temporal lobe white matter volume deficits. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 348-354.
- Suzdak PD, Glowa JR, Crawley JN, Schwartz RD, Skonick P, Paul SM. A selective imidazobenzodiazepine antagonist of ethanol in the rat. *Science* 1986; 234: 1243-1247.
- Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. The effects of neurohypophyseal hormones on tolerance to the hypothermic effect of ethanol. *Alcohol* 1985; 2: 567-674.
- Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Neurohypophyseal peptides and ethanol tolerance and dependence. *Front Horm Res* 1987; 15: 128-137.
- Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Brain monoamines are involved in mediating the action of neurohypophyseal peptide hormones on ethanol tolerance. *Acta Physiol Hung* 1988; 71: 459-466.
- Szabó G, Kovács GL, Székeli S, Telegdy G. Intraventricular administration of neurohypophyseal hormones interferes with the development of tolerance to ethanol. *Acta Physiol Hung* 1989; 73: 97-103.
- Szabó G, Hoffman PL, Tabakoff B. Forskolin promotes the development of ethanol tolerance in 6-hydroxydopamine-treated mice. *Life Sci* 1988a; 42: 615-621.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Biochemical pharmacology of alcohol. En: *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Meltzer HY (ed). New York, Raven Press 1987; 1521-1526.
- Tabakoff B, Hellevo K, Hoffman PL. Alcohol. En Shuster CR, Gust SW, Kuhar MJ, eds. *Handbook of experimental pharmacology*. Vol. 118. Heidelberg: Ed. Springer-Verlag; 1996. p. 373-458.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Biochemical pharmacology of alcohol. En Meltzer HY, ed. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Ed. Raven Press; 1987. p. 1521-26.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol and glutamate receptors. En: *Pharmacological effects of ethanol on the nervous system*. Deitrich RA, Erwin VG (eds). New York, Boca Raton, CRC Press 1996b; 73-93.
- Tabakoff B, Von Wartburg JP. Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: Metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 63: 957-966.
- Tabakoff B, Hellevo K, Hoffman PL. Alcohol. En: *Pharmacological aspect of drug dependence. Handbook of experimental pharmacology*. Shuster CR, Kuhar MJ (eds). Berlin, Springer 1996; 374-460.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Adenylyl cyclases and alcohol. En: *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. Cooper DMF (ed). New York, Raven Press 1998; 173-193.
- Tabakoff B, Hoffman PL. Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 1996a; 16: 909-912.
- Tarter RE, Edwards KL. Neuropsychology of alcoholism. En: *Alcohol and the brain, chronic effects*. Tarter RE, Van Thiel DH (eds). New York, Plenum Medical Book Co. 1985; 217-242.
- Thevananther S, Brecher AS. Interactions of acetaldehyde with plasma proteins of the renin-angiotensin system. *Alcohol* 1994; 11: 493-499.
- Thomas GJ, Dodd PR, Kril JJ, Harper CG. Alcoholism and aminoacid neurotransmitters in human brain. *Mol Neuropharmacol*. 1992; 2: 215-218.
- Ticku MK, Lowrimore P, Lehoullier P. Ethanol enhances of GABA induced ³⁶Cl-influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Res Bull* 1986; 17: 123-126.
- Tomkins DM, Lê AD, Sellers EM. Effect of 5-HT₃ antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure. *Psychopharmacology* 1995; 117: 479-485.
- Torvik A. Brain lesions in alcoholics. Neuropathological observations. *Acta Med Scand* 1987a; 717: 47-54.
- Torvik A. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Clin Neuropathol* 1987b; 6: 25-29.
- Torvik A, Lindboe CF, Rodge S. Brain lesions in alcoholics. A neuropathological study with clinical correlations. *J Neurol Sci* 1982; 56: 233-248.
- Trabert W, Betz T, Niewald M, Huber G. Significant reversibility of alcoholic brain shrinkage within 3 weeks of abstinence. *Acta Psychiat Scand* 1995; 92: 87-90.

- Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Ann J Psychiat* 1995; 152: 332-340.
- Victor M, Yakovlev PI. Korsakoff's psychic disorder in conjunction with peripheral neuritis. A translation of Korsakoff's original article with brief comments on the author and his contribution to clinical medicine. *Neurology* 1955; 5: 394-406.
- Victor M, Adams RD, Collins GH. The Wernicke-Korsakoff syndrome. Oxford, Blackwell Scientific 1971.
- Victor M, Adams RD, Collins GH. The Wernicke-Korsakoff syndrome and related disorders due to alcoholism and malnutrition. Philadelphia; FA Davis 1989.
- Volkow ND, Wang GJ, Hitzemann R, Fowler JS, Overall JE, Burr G, Wolf AP. Recovery of brain glucose metabolism in detoxified alcoholics. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 53-59.
- Wagner GW, Tavianini MA, Herrmann KM, Dixon JE. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain. *Biochemistry* 1981; 13:3884-3890.
- Walker DW, Barnes DE, Zorneyzer SF, Hunter BE, Kubanis P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 1980b; 209: 711-713.
- Walsh KW. Understanding brain damage. A primer of neuropsychological evaluation. Edinburgh, Churchill Livingstone 1985.
- Wan FJ, Berton F, Madamba SG, Francesconi W, Siggins GR. Low ethanol concentrations enhance GABAergic inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal pyramidal neurons only after block of GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5049-5054.
- Wang DC, Taraschi TF, Rubin E, Janes N. Configurational entropy is the driving force of ethanol action on membrane architecture. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1145: 141-148.
- Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytiä P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* 1996; 16: 3474-3485.
- Wenk GL, Pierce DJ, Struble RG, Price DL, Cork LC. Age-related changes in multiple neurotransmitter systems in the monkey brain. *Neurobiol Aging* 1989; 10: 11-19.
- White G, Lovinger DM, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated current but does not alter GABA-activated current in an isolated adult mammalian neurons. *Brain Res* 1990; 507: 332-336.
- Wik G, Borg S, Sjogren I, Wiesel FA, Blomqvist G, Borg J, Greitz T, Nyback H, Sedvall G, Stone-Elander S, Widen L. PET determination of regional cerebral glucose metabolism in alcohol-dependent men and healthy controls using ¹¹C-glucose. *Acta Psychiat Scand* 1988; 78: 234-241.
- Wilkinson DA. Examination of alcoholics by computed tomographic (CT) scans. A critical reviews. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6: 31-45.
- Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 243-250.
- Witek B, Košťaj A. Effect of ethanol administration on activities of some lysosomal hydrolases in the mouse. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 163-168.
- Wolf G., Wenzel U., Assmann K.J., Stahl R.A. Renal expression of aminopeptidase A in rat with two-kidney, one clip hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1935-1942.
- Woodward JJ, Gonzales RA. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated endogenous dopamine release from rat striatal slices: Reversal by glycine. *J Neurochem* 1990; 54: 712-715.
- Wozniak KM, Pert A, Linnoila M. Antagonism of 5-HT₃ receptors attenuates the effects of ethanol on extracellular dopamine. *Eur J Pharmacol* 1990; 187: 287-289.
- Woodward JJ. A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartic acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1994; 62: 987-991.
- Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂ and AT₄ and their functions. *Regul Pept* 1995; 59: 269-95.
- Wright JM, Peoples RW, Weight FF. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated current in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; 738: 249-256.
- Yang X, Criswell HE, Simson P, Moy S, Breese GR.

Evidence for a selective effects of ethanol on N-methyl-D-aspartate responses: ethanol affects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 114-124.

Yoshimura M, Tabakoff B. Selective effects of ethanol on the generation of cAMP by particular members of the adenylyl cyclase family. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 1435-1440.

Yu DH, Zhang L, Eisele JL, Bertrand D, Changeux JP, Weight FF. Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha-7-receptors involves the amino terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1010-1016.

Yurttas L, Dale BE, Klem WR. FTIR evidence for alcohol binding and dehydration in phospholipid and ganglioside micelles. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 863-869.

Zhang L, Oz M, Stewart RR, Peoples RW, Weight FF. Volatile general anaesthetic actions on recombinant nACh(alpha 7), 5-HT3 and Chimeric nACh(alpha7)-5-HT3 receptors expressed in xenopus oocytes. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 353-355.

Zimatkin SM, Dietrich RA. Ethanol metabolism in the brain. *Addict Biol* 1997; 2: 387-399.

.oOo.

RESUMEN DE LOS CURSOS DE DOCTORADO

PROGRAMA DE DOCTORADO

TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE PATOLOGÍAS VASCULARES E INFLAMATORIAS (403/3)

DPTO. RESPONSABLE: FARMACOLOGÍA (FACULTAD DE FARMACIA.
UNIVERSIDAD DE GRANADA)

COORDINADOR: D. ANTONIO ZARZUELO ZURITA

Título del Curso del Período de Docencia: CONTENIDOS

- HIPERTENSIÓN Y ATEROGÉNESIS

En este Curso se hace un repaso sobre la Fisiología y Fisiopatología relacionada con la Hipertensión y se profundiza en los diferentes tratamientos, desde las medidas higiénico-dietéticas (se hace un recorrido por los factores de riesgo: tabaco, obesidad, alcohol, sedentarismo, estrés, etc., y su relación con el mecanismo hipertensivo), hasta los tratamientos farmacológicos con Antihipertensores: **Diuréticos** (Diuréticos del Asa, Tiazidas y Ahorradores de potasio), **Inhibidores de la Actividad simpática** (entre otros los alfa y beta- bloqueantes), **Inhibidores del sistema Renina-Angiotensina – Aldosterona** (Inhibidores de la liberación de Renina: beta-bloqueantes, Inhibidores de Enzima Convertidora de Angiotensina: IECA, y Antagonistas de Receptores de Angiotensina II: ARA) y **Vasodilatadores directos** (Antagonistas de canales de calcio, Agonistas de canales de potasio y otros). De todos ellos se estudia la historia, clasificación, mecanismo de acción, efectos farmacológicos, farmacocinética, efectos adversos, contraindicaciones, usos clínicos y ventajas en la protección cardiovascular.

Sobre la Aterogénesis se repasa el mecanismo fisiológico y fisiopatológico y su implicación en la aterotrombosis y agregación plaquetaria. Se abordan los Antiagregantes Plaquetarios (Inhibidores de Ciclooxygenasas, Antagonistas de receptores TXA₂, Antagonistas de receptores Ia/IIa, Antagonistas de Receptores de ADP, antagonistas de Receptores 5HT_{2A}, Antagonistas de Receptores Iib/IIIa, Inhibidores de PDE, análogos de Prostaciclina y fármacos Antitrombina y aquellos fármacos que mejoran la función endotelial (Estatinas, IECA, Antagonistas del calcio, A.A.S.) como tratamiento farmacológico. De ellos se estudia la historia, clasificación, mecanismo de acción, efectos farmacológicos, farmacocinética, efectos adversos, contraindicaciones, usos clínicos y ventajas en la protección cardiovascular.

También se aborda la fisiología y fisiopatología de la Hemostasia y el tratamiento con Anticoagulantes Orales y Heparinas. Se inicia al estudio de Novedades Terapéuticas.

- PROCESOS INFLAMATORIOS CRÓNICOS

En este Curso se abordan aquellas enfermedades que son resultado de un proceso inflamatorio que es crónico. Se hace un repaso sobre el mecanismo de la inflamación y

su aparición en Asma, Cefalea, Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, Enfermedades Reumáticas: Artritis Reumatoide y Artrosis, y Gota.

Se realiza un extenso estudio de los tratamientos farmacológicos existentes para cada una de estas enfermedades. Con especial interés en los Antiinflamatorios, tanto los no esteroideos (AINES) como los esteroideos (Glucocorticoides), así como en fármacos Inmunosupresores, ya que algunas de estas enfermedades son enfermedades autoinmunes o cursan con un componente inmunológico importante. Se realiza una introducción de las Novedades Terapéuticas en el campo de la Inmunología relacionada con estas enfermedades.

- **NOVEDADES TERAPÉUTICAS EN PROCESOS PATOLÓGICOS VASCULARES.**

Se realiza un trabajo-seminario conjunto entre los alumnos y dirigido por D. Eduardo Ros, Jefe del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario Virgen de las Nieves- San Cecilio.

- **FARMACOLOGÍA DE TRASTORNOS HORMONALES: DIABETES, OSTEOPOROSIS Y DEL APARATO GENITAL FEMENINO.**

En este Curso se realiza un estudio del Sistema Endocrino y su relación con la Diabetes, Osteoporosis y trastornos hormonales relacionados con el aparato genital femenino.

Respecto a la Diabetes se hace un repaso de la enfermedad, clasificación y los posibles tratamientos tanto de cambios en estilos de vida e higiénico-sanitarios como farmacológico. Estudiamos los Antidiabéticos Orales y las Insulinas.

Con la Osteoporosis se realiza un repaso de la enfermedad, fisiología y fisiopatología ósea y hormonal, sus complicaciones y el tratamiento preventivo y sintomático farmacológico. Estudiamos los Estrógenos, Calcio y vitamina D, Calcitonina, Bisfosfonatos, PTH humana y otros.

El estudio del Aparato Genital Femenino se realiza desde el tratamiento con hormonas sexuales en sus diferentes vías de administración como Terapia Sustitutiva en la menopausia y osteoporosis, así como en anticoncepción. También se abarcan los fitoestrógenos.

- **AVANCES EN PLANTAS MEDICINALES Y FITOTERAPIA I. TRATAMIENTO DE ALTERACIONES METABÓLICAS, DIGESTIVAS, GENITO-URINARIAS, CUTÁNEAS Y NEOPLÁSICAS**

En este Curso se hace un breve repaso y actualización de conocimientos de la Fitoterapia relacionada con las alteraciones metabólicas, digestivas, genito-urinarias, cutáneas y neoplásicas.

Se repasa la Fisiología y Fisiopatología de cada uno de los sistemas afectados.

En las ALTERACIONES METABÓLICAS nos centramos en el Metabolismo Lipoproteico y su papel en los niveles de lípidos y colesterol circulantes en plasma sanguíneo y su implicación en enfermedades cardiovasculares. Se incide sobre los métodos a seguir para la reducción de niveles de éstos en plasma incluyendo la Fitoterapia. Se hace una revisión de aquéllas que se utilizan para disminuir niveles de colesterol, haciendo un estudio de la especie, acción farmacológica, efectos secundarios y contraindicaciones. También se hace un estudio de la Obesidad, gran problema de nuestra sociedad y resultado en la mayoría de casos del sedentarismo y los malos hábitos dietéticos. Abordamos la Fitoterapia de la Obesidad: disminución del apetito, lipólisis, inhibición de la lipogénesis, coadyuvantes diuréticas, digestivas y ansiolíticas, así como el uso de laxantes y el papel de la fibra terapéutica.

En las ALTERACIONES DIGESTIVAS se hace un breve repaso de Fisiología y Fisiopatología del Aparato Digestivo. Se incide en las alteraciones gástricas: Dispepsias y fitoterapia con actividad antiespasmódica, carminativa, colerética o proteolítica; Gastritis y Úlceras y su tratamiento con plantas protectoras, antisecretoras, cicatrizantes y estimulantes de la secreción de mucus. También se incide en las alteraciones hepáticas tanto como trastorno de los hepatocitos y su tratamiento con plantas hepatoprotectoras como los trastornos biliares y su tratamiento con plantas coleréticas. Por último se estudian las alteraciones intestinales: Diarrea y el tratamiento con plantas astringentes y adsorbentes; y Estreñimiento y su tratamiento con laxantes mecánicos y laxantes estimulantes.

En las Alteraciones Genito-urinarias y trastornos de la piel, tras repasar fisiología y fisiopatología se estudian las plantas utilizadas como tratamiento: diuréticas, antisépticas, etc. En las Alteraciones Neoplásicas se estudia el papel de las plantas, en concreto de la curcumina, como quimiopreención del cáncer.