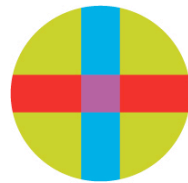


Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Ciencias Biomédicas



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Efectos del alcohol y la cocaína sobre el estado oxidativo y la electrofisiología oculares: tratamiento con naltrexona y topiramato

TESIS DOCTORAL

Presentada por: María Victoria Sánchez Villarejo

Dirigida por: Dr. D. Francisco J. Romero Gómez

Dra. Dña. María Miranda Sanz

Valencia

2013

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
1. Estudio de la retina.....	9
1.1. Anatomía general de la retina	9
1.2. Características anatómicas de la mácula	10
1.3. Anatomía microscópica.....	10
1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR)	13
1.3.2. Fotorreceptores	14
1.3.3. Retina interna	16
1.4. Vía sináptica hasta el córtex	18
2. Estudio neurofisiológico y electrofisiológico de la retina	22
2.1. Recuerdo fisiológico.....	23
2.1.1. Potencial de acción en célula aislada.....	23
2.1.2. Potencial de acción compuesto.....	23
2.1.3. Potencial postsináptico.....	24
2.2. Aspectos técnicos del registro de la actividad eléctrica	24
2.2.1. Amplificación	24
2.2.2. Tipos de electrodos	25
2.2.3. Actividad eléctrica voluntaria, espontánea y evocada.....	26
2.2.4. Promedio de la señal.....	26
2.3. Características técnicas del electroretinograma.....	26
2.3.1. Origen del electroretinograma	27
2.3.2. Tipos de electroretinograma.....	29
2.4. Electrofisiología de la vía visual. Potencial evocado visual (PEV).....	31
2.4.1. Origen de los potenciales evocados visuales.....	32
2.4.2. Tipos de potenciales evocados visuales	32
2.4.3. Origen retiniano de los potenciales evocados visuales	32
3. Alcoholismo	33
3.1. Definición	34
3.2. Etiopatogenia	34
3.3. Farmacología del etanol	35
3.3.1. Absorción.....	35
3.3.2. Distribución.....	35

3.3.3. Eliminación	35
3.3.4. Metabolismo hepático del etanol	36
3.4. Efectos tóxicos del etanol	37
3.5. Efectos del etanol sobre el ojo	38
3.5.1. Síndrome alcohólico fetal	38
3.5.2. Acción del alcohol sobre el funcionamiento de la retina: ERG y PEV	39
3.5.3. Alcohol y estrés oxidativo en el ojo	40
4. Consumo de Cocaína.....	41
4.1. Mecanismos de acción	42
4.2. Etiopatogenia de la adicción a cocaína	43
4.3. Farmacología de la cocaína.....	46
4.3.1. Absorción.....	46
4.3.2. Distribución.....	46
4.3.3. Metabolismo	46
4.3.4. Eliminación	47
4.4. Efectos tóxicos de la cocaína	47
4.5. Efectos de la cocaína sobre el ojo	48
5. Fisiología del estrés oxidativo	49
5.1. Estrés Oxidativo. Radicales libres	49
5.1.1. Papel fisiológico y patológico	49
5.1.2. Generación de radicales libres	50
5.1.3. Peroxidación lipídica.....	50
5.2. Defensa Antioxidante.....	51
5.2.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica.....	51
5.2.2. El sistema glutatión	51
6. La naltrexona y el alcoholismo	53
6.1. Mecanismos de acción del alcohol en el sistema de refuerzo del cerebro	53
6.2. Naltrexona como antagonista de receptores mu opioides.....	55
6.3. Naltrexona en la dependencia a alcohol.....	56
7. El topiramato y la adicción a cocaína	58
7.1. Topiramato.....	58
7.2. Mecanismo de acción del topiramato	58
7.3. Usos terapéuticos del topiramato	59
7.4. El topiramato en la adicción.....	59

7.5. Efectos de la topiramato sobre el ojo.....	60
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	62
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	64
1. Tratamiento de los animales.....	65
1.1. Condiciones de estabulación.....	65
1.2. Manejo de animales.....	65
2. Diseño de los protocolos experimentales.....	66
2.1. Experimento de alcohol.....	66
2.1.1. Modelo experimental de alcohol.....	66
2.1.2. Administración de la dieta Lieber-De Carli.....	67
2.1.3. Medición del alcohol en sangre.....	67
2.1.4. Administración de naltrexona.....	67
2.2. Experimento de cocaína.....	68
2.2.1. Modelo experimental de cocaína.....	68
2.2.2. Adiministración de cocaína.....	68
2.2.3. Administración de topiramato.....	69
3. Análisis electrofisiológicos de la retina y la vía visual.....	69
3.1. Electrorretinograma.....	69
3.2. Potenciales evocados visuales.....	71
4. Obtención y preparación de las muestras.....	72
5. Análisis bioquímicos.....	72
5.1. Determinación de proteínas.....	72
5.1.1. Fundamento teórico.....	72
5.1.2. Soluciones.....	72
5.1.3. Procedimiento para la cuantificación de proteínas.....	73
5.2. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa.....	73
5.2.1. Fundamento teórico.....	73
5.2.2. Soluciones.....	74
5.2.3. Procedimiento analítico para la determinación de la actividad glutatión peroxidasa.....	74
5.3. Determinación de la concentración de glutatión y glutamato.....	75
5.3.1. Fundamento del método.....	75
5.3.2. Equipo y soluciones.....	75
5.3.3. Procedimiento analítico para la determinación de GSH y glutamato.....	76
5.4. Determinación de la concentración de malondialdehído.....	77

5.4.1. Fundamento del método.....	77
5.4.2. Equipo y soluciones.....	77
5.4.3. Procedimiento analítico para la determinación del MDA.....	78
6. Análisis estadísticos	78
6.1. Estadístico descriptivos	78
6.2. Homocedasticidad	79
6.3. Análisis de la varianza (ANOVA)	79
IV. RESULTADOS.....	81
1. Pesos	82
1.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona.....	82
1.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato	83
2. Electrorretinograma	83
2.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona.....	83
2.1.1. Tiempo implícito de la onda a.....	83
2.1.2. Amplitud de la onda a.....	84
2.1.3. Tiempo implícito de la onda b.....	85
2.1.4. Amplitud de la onda b.....	85
2.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato	86
2.2.1. Tiempo implícito de la onda a.....	86
2.2.2. Amplitud de la onda a.....	86
2.2.3. Tiempo implícito de la onda b.....	87
2.2.4. Amplitud de la onda b.....	88
3. Potenciales evocados visuales	88
3.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona.....	88
3.1.1. Tiempo implícito de los potenciales evocados visuales	88
3.1.2. Amplitud de los potenciales evocados visuales	89
3.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato	90
3.2.1. Tiempo implícito de los potenciales evocados visuales	90
3.2.2. Amplitud de los potenciales evocados visuales	90
4. Parámetros bioquímicos indicativos de estrés oxidativo en ojo	91
4.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona.....	91
4.1.1. Actividad Glutatión Peroxidasa (GSH-Px) en ojo	91
4.1.2. Determinación de glutatión (GSH) en ojo.....	92
4.1.3. Determinación de malondialdehído (MDA) en ojo.....	93

4.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato	94
4.2.1. Actividad Glutación Peroxidasa (GSH-Px) en ojo	94
4.2.2. Determinación de glutación (GSH) en ojo	95
4.2.3. Determinación de malondialdehído (MDA) en ojo	96
4.2.4. Determinación de glutamato en ojo	97
4.2.5. Correlación entre los niveles de glutamato y la actividad GSH-Px	98
V. DISCUSIÓN	99
1. Efectos del alcohol sobre la electrofisiología de la retina.....	100
1.1. Aumento del tiempo implícito de la onda a tras el tratamiento crónico con alcohol.....	101
1.2. Disminución de la amplitud de la onda b por el alcohol	102
2. Efectos del alcohol en la vía sináptica hasta el cortex visual	104
2.1. Aumento del tiempo de latencia de los PEV inducido por el alcohol	105
2.2. Disminución de la amplitud de los PEV inducido por el alcohol.....	105
3. Efecto del alcohol sobre parámetro bioquímicos indicativos de estrés oxidativo.....	106
4. Efectos de la cocaína sobre la electrofisiología de la retina	107
5. Efectos de la cocaína y el topiramato sobre parámetros bioquímicos indicativos de estrés oxidativo	108
6. Efectos de la cocaína sobre los niveles de glutamato	109
VI. CONCLUSIONES	111
VII. BIBLIOGRAFÍA	113
ÍNDICE DE TABLAS	135
ÍNDICE DE FIGURAS	137
ANEXO	140

I. INTRODUCCIÓN

1. Estudio de la retina

1.1. Anatomía general de la retina

La retina es una fina y delicada membrana derivada del neuroectodermo, que cubre los 2/3 posteriores de la superficie interna del globo ocular. Es el sustrato morfológico físico en el que se realiza la transformación de la energía lumínica en impulsos eléctricos que, conducidos a la corteza cerebral, hacen posible el fenómeno complejo de la visión. A causa de su origen embriológico prosencefálico se considera normalmente como una parte especialmente diferenciada del cerebro.

Los fotorreceptores (denominados conos y bastones) detectan la luz y las células del epitelio pigmentario de la retina proporcionan su aporte metabólico. La estructura retiniana interna está sostenida por las células de Müller; el tejido neurorretiniano restante integra y procesa la información visual, de forma que en el momento en que la señal visual alcanza los axones del nervio óptico ya existe una codificación considerable de la información (Spalton and Marshall, 1995).

La región posterior de la retina se denomina mácula y es la responsable de la visión central y del color. Por fuera de esta zona, la retina se encarga de la visión periférica y con poca iluminación.

La retina se extiende desde la mácula en el polo posterior, hasta 5 mm por delante del ecuador del globo, finalizando en la ora serrata donde se continúa con el epitelio no pigmentado de la pars plana del cuerpo ciliar.

Su grosor es menor en la periferia (0,1 mm) y va aumentando progresivamente hacia el polo posterior (0,23 mm). Sin embargo, en el centro de la fovea se adelgaza otra vez (0,1 mm), y de nuevo aumenta de grosor (0,21 mm) alrededor del nervio óptico.

La retina sensorial está adherida firmemente al epitelio pigmentario retiniano (EPR) en condiciones fisiológicas, aunque las dos capas se pueden separar fácilmente cuando se acumula líquido por debajo del neuroepitelio, como ocurre durante el desprendimiento de retina.

1.2. Características anatómicas de la mácula

Desde el punto de vista anatómico, la mácula mide unos 5,5 mm y en su centro se encuentra la fovea, una depresión de 1,5 mm de diámetro. El suelo de la fovea recibe el nombre de foveola y tiene un diámetro de 0,35 mm. Es la única región de la fovea en la que no se encuentran bastones. En la foveola, la densidad de los conos es la mayor (15.000/mm²), descendiendo hasta unos 4.000-5.000/mm² en la periferia. La retina del adulto joven contiene aproximadamente 120 millones de bastones y 6 millones de conos (Spalton and Marshall, 1995).

El grosor de la mácula es la mitad que el de la retina periférica debido a que las capas de fibras nerviosas, células ganglionares y plexiforme interna están ausentes en esta zona. Este hecho mejora la sensibilidad visual de esta región especializada en la visión máxima, al disminuir el grosor de tejido que la luz debe atravesar para alcanzar los conos (Schubert, 1999).

1.3. Anatomía microscópica

La retina consta de cuatro capas de células y dos capas de conexiones neuronales. Además, la capa de fotorreceptores está en contacto con el epitelio pigmentario de la retina (Figura 1).

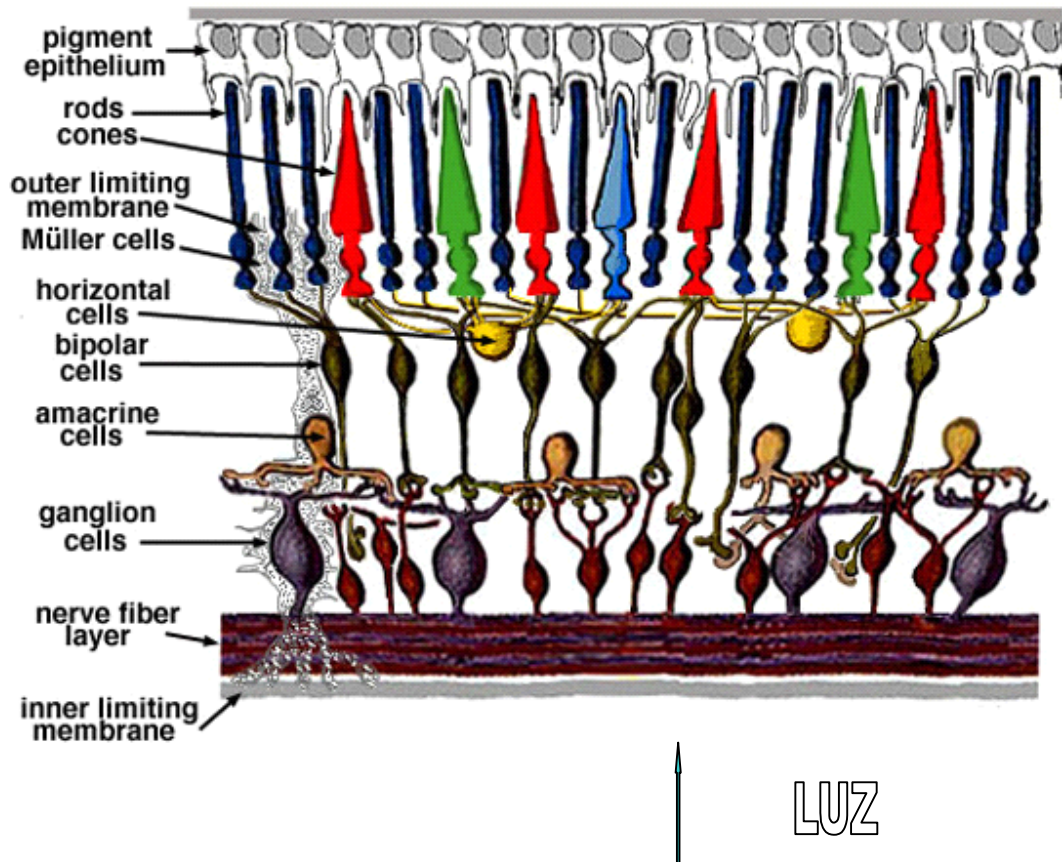


Figura 1. Representación esquemática de las diferentes células que componen la retina y sus conexiones (Kolb et al., 2005).

En cortes histológicos de la retina esta sencilla estructura de seis capas se pierde y se observa un aspecto poliestratificado mucho más complejo que deriva de la yuxtaposición anatómica de partes similares de células adyacentes. Así, la estructura de la retina sensorial se puede dividir en nueve capas que, desde fuera hacia dentro, son (Figura 2):

- Fotorreceptores.
- Membrana limitante externa.
- Capa nuclear externa.
- Capa plexiforme externa.
- Capa nuclear interna.
- Capa plexiforme interna.
- Capa de células ganglionares.
- Capa de fibras nerviosas.
- Membrana limitante interna.

Este patrón está presente en toda la retina excepto en la fovea.

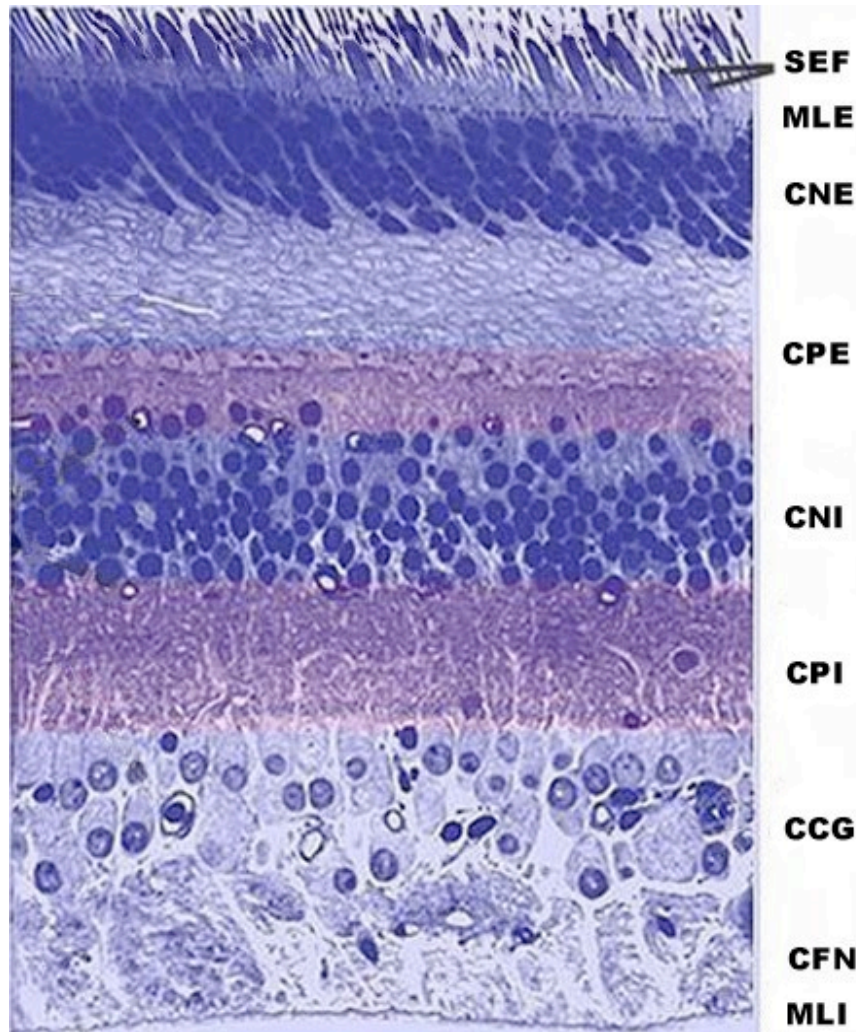


Figura 2. Anatomía microscópica de la retina. (SEF: Segmentos externos de fotorreceptores. MLE: Membrana limitante externa. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa células ganglionares. CFN: Capa fibras nerviosas. MLI: Membrana limitante interna) (Kolb et al., 2005).

Las denominadas “membranas limitantes” están formadas por componentes de las células de Müller, una célula glial retiniana cuyos procesos se extienden a través de las capas retinianas entre las membranas limitantes, y cuyos núcleos se encuentran en la capa nuclear interna. La membrana limitante externa, en la cara más externa de los segmentos internos de los fotorreceptores, no es una membrana real, sino una alineación de complejos de unión entre las células de Müller y las células fotorreceptoras. Por el contrario, la membrana limitante interna de la superficie retiniana es una membrana acelular resistente, situada encima de las células de Müller y en la que se insertan fibras de la membrana hialoidea de la corteza vítrea (Spalton and Marshall, 1995).

1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR)

El EPR consta de una única capa de células especializadas adyacente a los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina (Figura 1), que se extiende desde la papila óptica a la ora serrata. Su función es apoyar y mantener las células fotorreceptoras suprayacentes y con este fin sustenta cinco procesos principales: la absorción de la luz dispersa, el transporte activo de metabolitos, la provisión de una barrera hematorretiniana, la regeneración de los pigmentos visuales (Figura 3) y la fagocitosis (Marmor, 1999).

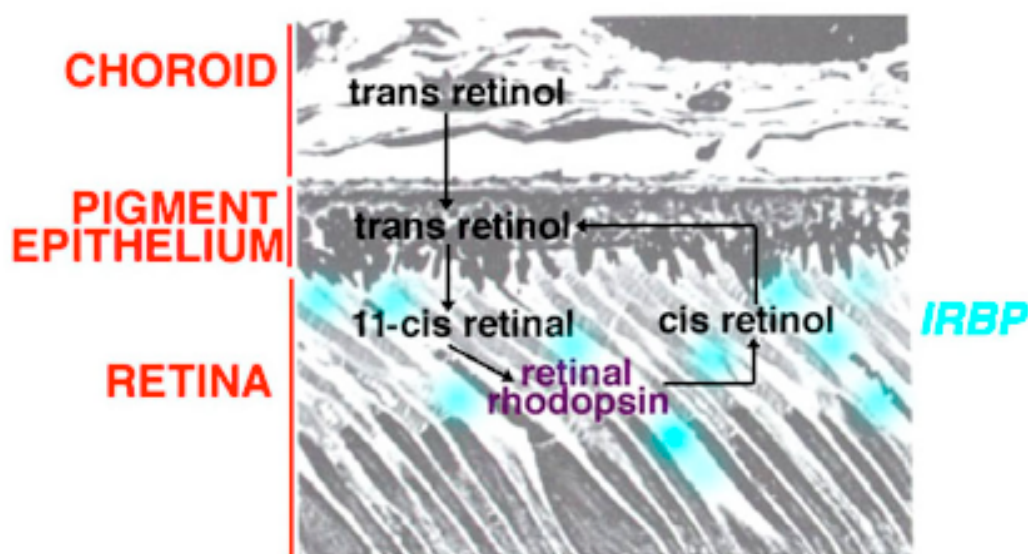


Figura 3. Papel del epitelio pigmentario de la retina en la regeneración de los pigmentos visuales (Kolb et al., 2005).

Las células del epitelio pigmentario tienen morfología hexagonal y contienen gránulos fusiformes de melanina marrón-negra que se localizan cerca de la zona apical (Marmor, 1991). Su superficie basal descansa sobre la membrana de Bruch y su superficie apical está íntimamente relacionada con la capa de fotorreceptores. Esta zona se caracteriza por poseer numerosos microvilli que interdigitan con los segmentos externos de los conos y bastones, relación que es necesaria para la función visual normal (Figura 4). Así, las células del EPR llevan a cabo el transporte y la acumulación activa de metabolitos que difunden a través de la membrana de Bruch desde la coriocapilar subyacente, y también excretan los productos de desecho por mecanismos activos, ya que la circulación arterial retiniana no contribuye a las necesidades metabólicas de los fotorreceptores (Spalton and Marshall, 1995).

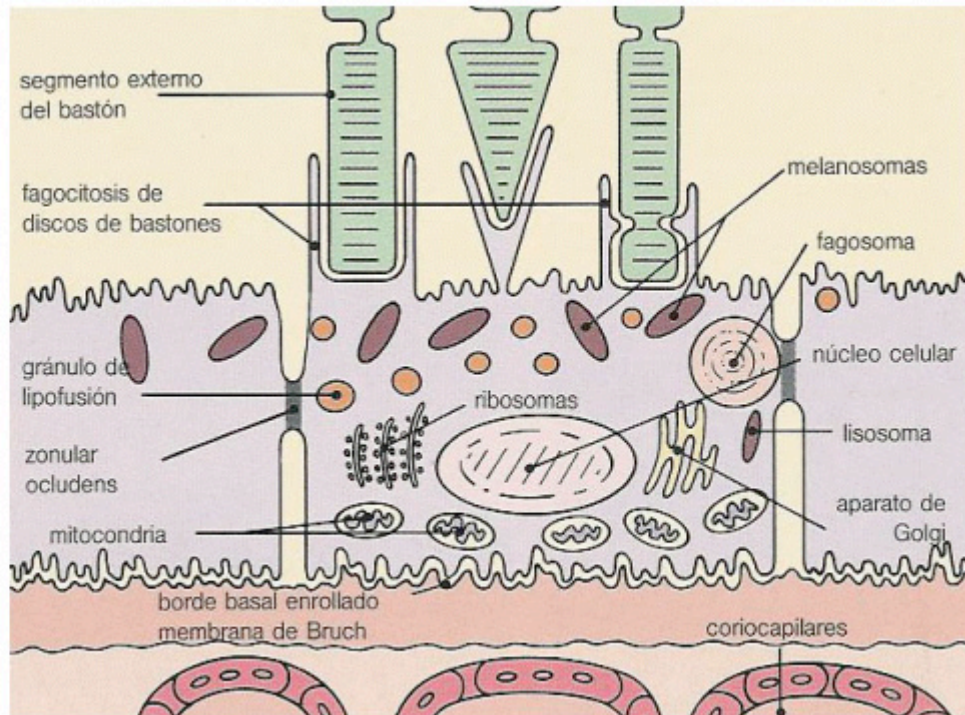


Figura 4. Representación esquemática de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por las células del epitelio pigmentario de la retina <http://kepler.uag.mx/uagwb/oftav10/anatomia/masinfo.htm>.

Las células vecinas del epitelio pigmentario se encuentran unidas por adherencias ultraestructurales especializadas entre las membranas celulares adyacentes, llamadas *zónula adherens* y *zónula ocludens*. Esto crea una barrera que impide el libre intercambio de macromoléculas entre los fotorreceptores y la circulación coroidea - barrera hematorretiniana externa- (Cunha-Vaz, 1979).

1.3.2. Fotorreceptores

Son las células encargadas de la absorción de la luz y de su transformación en impulsos nerviosos mediante los fotopigmentos que poseen. Se sitúan entre la capa de epitelio pigmentario y la plexiforme externa de la que forman parte. Se diferencian dos tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones. Los bastones son células delgadas de 1-3 μ m de espesor y 40-60 μ m de longitud que contienen el pigmento rodopsina en su segmento externo y actúan como fotorreceptores para la visión nocturna. Los conos tienen 1-1,5 μ m de ancho y 75 μ m de largo y se relacionan con la visión diurna y del color. Aunque aparentemente iguales, se distinguen tres tipos de conos utilizando

métodos espectroscópicos, según el tipo de pigmento visual que poseen de absorción máxima a 445, 535, y 570nm, respectivamente- (Shichi et al., 1983).

Los conos y los bastones muestran la misma organización estructural básica (Spalton and Marshall, 1995). Dicha estructura consta de (Figura 5):

- Un **segmento externo**, que es la porción de la célula sensible a la luz y que está constituido por una pila de discos huecos, como monedas, cuyas membranas contienen las moléculas del pigmento visual.
- Una región comprimida denominada **cilio**.
- Un **segmento interno**, que en cada caso se divide en dos, un elipsoide externo y un mioide interno. El elipsoide contiene mitocondrias y proporciona energía para los procesos de transducción del segmento externo; el mioide contiene cuerpos de Golgi y ribosomas para la elaboración de membranas y componentes celulares.
- Una **fibra de conexión externa**, que discurre desde el segmento interno hasta el núcleo.
- Un **núcleo**.
- Una **fibra de conexión interna**, que discurre desde el núcleo a la región sináptica.
- Una **región sináptica**. En ambas células, la región sináptica contiene vesículas, y la mediación de la información a través de la sinapsis se realiza mediante transmisores químicos. Ambas células contienen en la superficie de su sinapsis conexiones invaginadas con componentes de neuronas intermediarias profundas. Estas sinapsis invaginadas se denominan “tríadas” porque contienen tres procesos; generalmente, uno de una célula bipolar y dos de células horizontales. Los bastones tienen una sola tríada, mientras que los conos pueden tener hasta veinte.

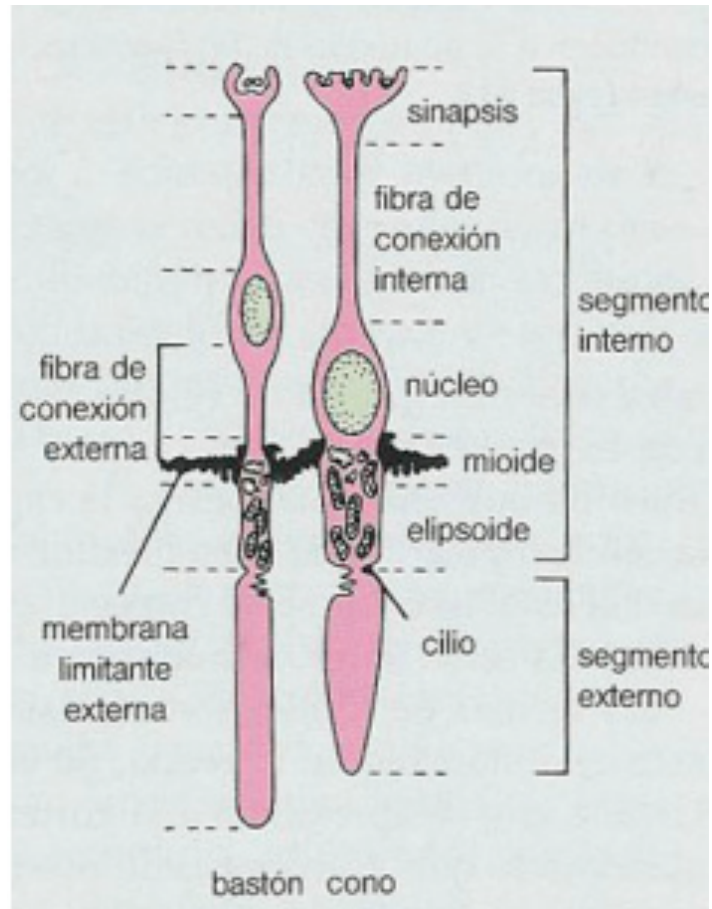


Figura 5. Representación esquemática de la ultraestructura de las células fotorreceptoras retinianas (Spalton and Marshall, 1995).

1.3.3. Retina interna

La capa nuclear interna contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, las células amacrinas y las células de Müller, que son unas células gliales especializadas. Las células bipolares no conectan los fotorreceptores directamente con las células ganglionares, ya que en las capas plexiformes externa e interna, respectivamente, intervienen los procesos de las células horizontales y amacrinas. Así pues, las células horizontales conectan grupos de células fotorreceptoras y modifican su salida en grupo a través de las tríadas en las sinapsis del fotorreceptor antes de que una señal pase a la capa plexiforme interna gracias a la célula bipolar. En la capa plexiforme interna, las células bipolares suelen establecer sinapsis con células amacrinas, que, a su vez, modifican la señal antes de que pase a las células ganglionares (Spalton and Marshall, 1995).

Las células de Müller son células gliales especializadas que forman el andamiaje de la retina. Es la célula glial predominante en la retina, representando alrededor del 90% de las mismas. Se extienden radialmente en el espesor de la retina, situando sus cuerpos celulares en la capa nuclear interna, y proyectando sus procesos entre los cuerpos celulares neuronales en las capas nucleares, y envolviendo grupos de procesos de estas últimas células en las capas plexiformes (Figura 6). De hecho, los procesos neuronales en la retina sólo contactan de forma directa, sin el recubrimiento de las células de Müller, en su sinapsis. Las porciones más internas de las fibras de Müller producen por mecanismos activos la membrana limitante interna acelular y fibrosa, que es una verdadera membrana enormemente resistente.

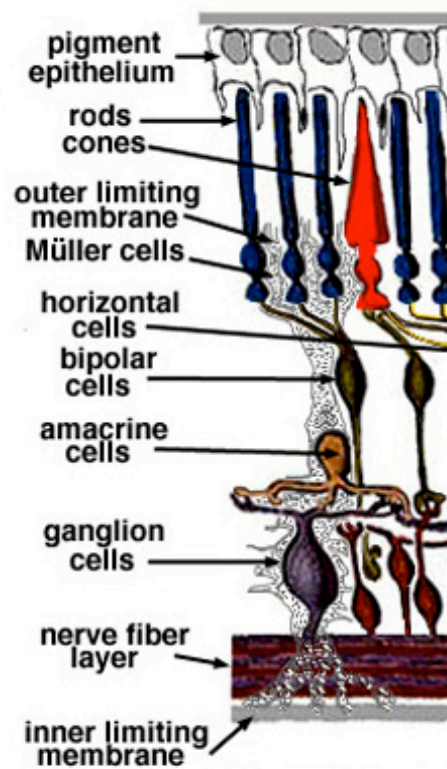


Figura 6. Disposición de las células de Müller en el espesor de la retina (Kolb et al., 2005).

Además de sostener la estructura retiniana, las células de Müller parecen estar relacionadas con la nutrición de los segmentos internos de los fotorreceptores y la generación de impulsos nerviosos. Actúan como un reservorio iónico durante la hiperpolarización del fotorreceptor por la luz, que se refleja en su contribución a la onda b del electroretinograma (ERG) (Celesia, 1988, Kofuji et al., 2000). Contribuyen a la

homeostasis del K^+ (Oakley et al., 1992, Kofuji et al., 2000), a la regulación del pH (Dawson et al., 1988) e intervienen en el metabolismo de los retinoides (Kolb et al., 2005). También constituyen el principal elemento del tejido cicatricial, o gliosis, que es la respuesta característica de la retina a la enfermedad o la destrucción celular (Barnett and Osborne, 1995, Woldemussie et al., 2004).

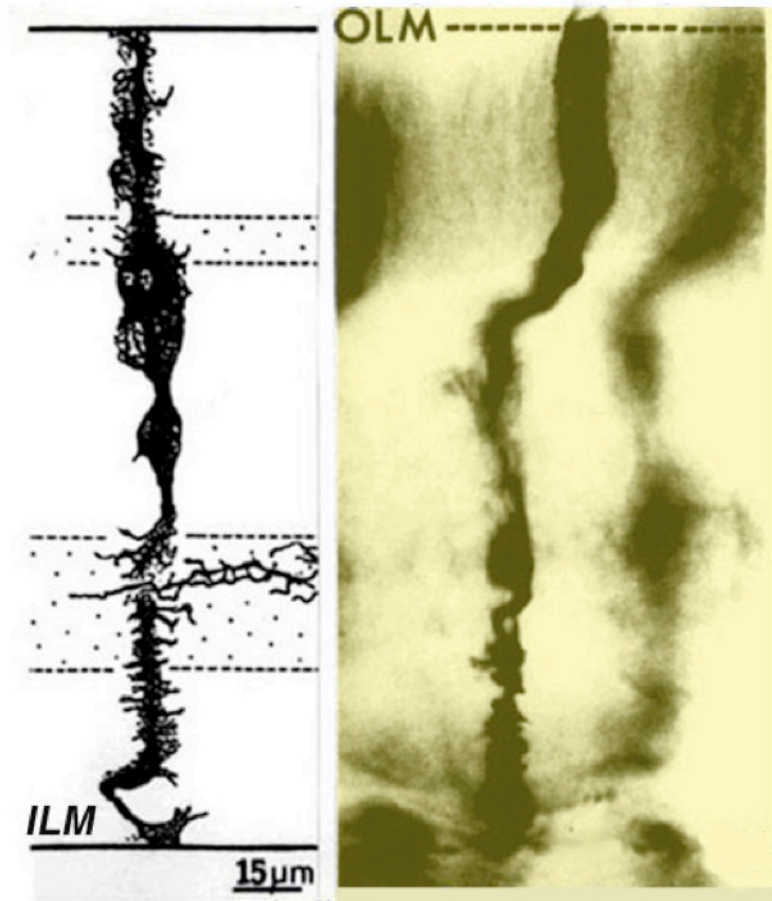


Figura 7. La célula de Müller. A la izquierda visión esquemática. A la derecha, célula de Müller revelada mediante tinción de Golgi. ILM: membrana limitante interna; OLM: membrana limitante externa (Kolb et al., 2005).

1.4. Vía sináptica hasta el córtex

La retina convierte la energía fotópica en señales eléctricas y procesa estas señales en patrones complejos que son transferidos al cuerpo geniculado lateral y desde aquí al córtex visual del lóbulo occipital.

Esta vía nerviosa está constituida por los fotorreceptores y una serie de neuronas. Los fotorreceptores convierten la señal luminosa en energía eléctrica por la acción de sus fotorreceptores, y sus núcleos constituyen la capa nuclear externa. En la capa

plexiforme externa los axones de los conos y bastones establecen sinapsis con las dendritas de las células bipolares, y también con las células horizontales. Las células bipolares, cuyos núcleos constituyen la mayor parte de la capa nuclear interna, establecen sinapsis en la plexiforme interna con las células ganglionares, y también con las células amacrinas. Los axones de las células ganglionares forman la capa de fibras nerviosas que a través del nervio óptico llegan al cuerpo geniculado externo, donde hacen sinapsis con las células tálamo-corticales, cuyos axones se extienden a través de las radiaciones ópticas hasta llegar al córtex occipital (Schubert, 1999).

A diferencia de la mayoría de las neuronas, los fotorreceptores no responden a los estímulos con un potencial de acción, siguiendo la ley del todo o nada, sino que su respuesta a la luz se produce con cambios graduales en el potencial de membrana. Los bastones responden lentamente, sumando el efecto de los fotones absorbidos durante un intervalo de 100 ms. De este modo pueden ser sensibles a pequeñas cantidades de luz.

A pesar de que la proporción de bastones y conos es de 20:1, el sistema de conos tiene una mejor resolución espacial, al menos por dos razones. Primero, los conos se concentran en la fovea, especialmente en la foveola, como ya se ha mencionado, donde la imagen es menos distorsionada. En segundo lugar, el sistema de los bastones es convergente: muchos bastones realizan sinapsis sobre una misma interneurona, una célula bipolar. Las señales de los bastones se van acumulando en la interneurona, reforzando la señal, intensificando la respuesta evocada por la luz, y permitiendo al cerebro detectar luz débil. La convergencia, en cambio, reduce la capacidad de los bastones para captar variaciones espaciales en la imagen visual, ya que las señales de los bastones adyacentes son promediadas en la interneurona. Los conos, por el contrario, convergen escasamente en cada célula bipolar, permitiendo mejor resolución espacial (Figura 8).

En las células ganglionares, la información se transmite como trenes de potenciales de acción. Como ya hemos descrito, entre los fotorreceptores y las células ganglionares existen tres clases de interneuronas: bipolares, horizontales y células amacrinas. Estas células transmiten señales del fotorreceptor a las células ganglionares. Combinan respuestas de muchos fotorreceptores, de forma que la respuesta eléctrica evocada en las células ganglionares depende en gran medida del patrón de luz que estimule la retina y de su variación en el tiempo.

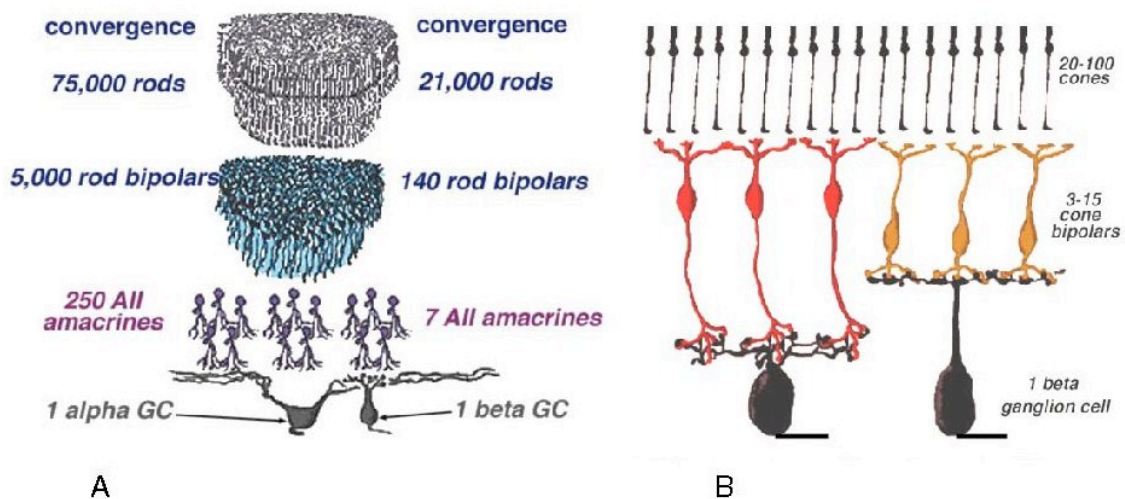


Figura 8. Esquemas de convergencia de las células fotorreceptoras en la retina. A: Convergencia de bastones sobre células ganglionares alfa o beta. B: Convergencia de conos sobre células ON y OFF ganglionares beta (Kolb et al., 2005).

La estimulación de conos y bastones inicia el proceso de descomposición de la imagen en sus elementos, que se continúa en la primera sinapsis de la vía visual entre los fotorreceptores y las células bipolares. Éstas poseen diferentes tipos de receptores para el glutamato, que permite modificar su respuesta celular ante aferencias similares. Algunos receptores para el glutamato se sensibilizan rápidamente, mientras que otros lo hacen de forma gradual.

El glutamato, en la retina, es el principal neurotransmisor de la conducción vertical. La primera transmisión sináptica entre fotorreceptor y la siguiente capa neuronal utiliza este neurotransmisor (Massey, 1990) y dos tipos de canales diferentes: el metabotrópico GMPc dependiente, localizado en células ON bipolares, y el ionotrópico, vía AMPA, en las células OFF bipolares y horizontales (Slaughter and Miller, 1981).

Los receptores que responden al glutamato activan las células OFF bipolares de la vía visual, detectando imágenes oscuras sobre un fondo luminoso. Otras células bipolares tienen receptores inhibitorios para el glutamato, evitando la activación al ser expuestas al neurotransmisor. Estos receptores activan las células ON bipolares, detectando imágenes luminosas sobre fondo oscuro.

La estimulación lumínica de los fotorreceptores detiene la liberación de glutamato, activándose así las células ON bipolares, que liberan glutamato al siguiente nivel sináptico (Figura 9).

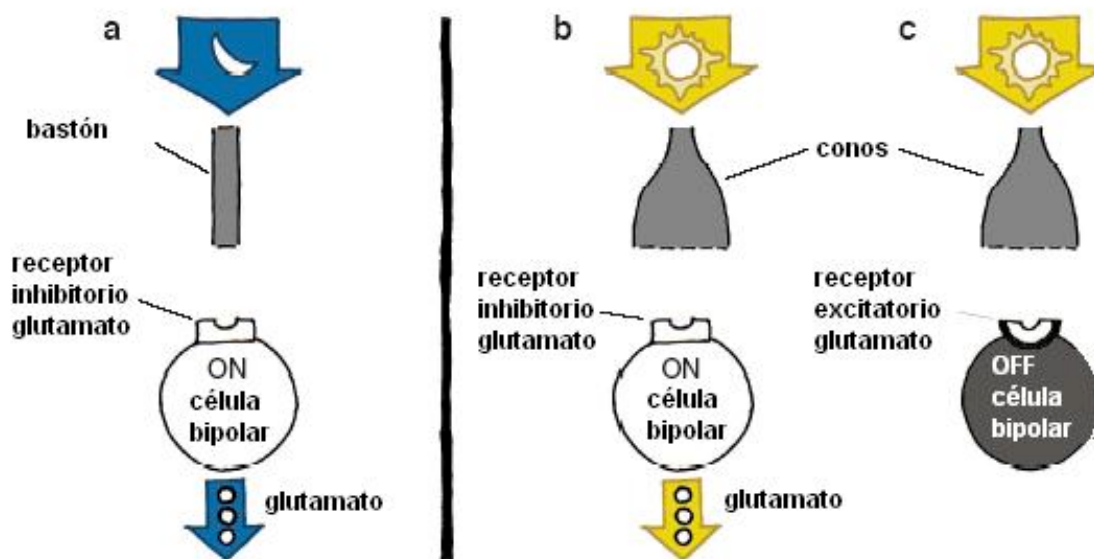


Figura 9. Esquema de la transmisión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares mediada por glutamato. (Kolb, 2003).

Las células bipolares poseen ambos tipos de receptores para el glutamato en las dendritas de la capa plexiforme externa, mientras que en su extremo axonal, en la capa plexiforme interna, se localizan canales y receptores para el ácido gamma aminobutírico (GABA) tipo A, B, y C, dopamina D1 y glicina. Las células ganglionares poseen todos estos receptores, junto con receptores para la acetilcolina (Keyser et al., 1993) y, por primera vez en la retina, receptores NMDA (Yazejian and Fain, 1992).

El procesamiento paralelo de las características de la imagen transmitida a través de canales ON y OFF es fundamental para la visión y comienza en el primer nivel sináptico de la retina, donde las células horizontales reciben aferencias de los conos. En realidad, cada célula horizontal conecta con numerosos conos, teniendo un amplio campo receptor que se incrementa por uniones estrechas con células horizontales vecinas.

La neurotransmisión inhibitoria, mediada por el GABA, se realiza gracias a las células amacrinas y algunos tipos de células horizontales (Marc, 1994). Existen tres tipos de receptores GABA (A, B, y C) ampliamente distribuidos por la retina. En la retina de rata, las acciones y distribución de los subtipos de receptores B y C se limitan a unos tipos específicos de neuronas. El subtipo B se ha localizado en células horizontales y amacrinas, concretamente en el subtipo A17, mientras que el subtipo C se limita a células amacrinas y ganglionares (Koulen et al., 1998).

Las células amacrinas se dividen prácticamente en dos grupos, según usen la glicina o el GABA como neurotransmisores.

Las células amacrinas glicinérgicas se distribuyen verticalmente por estratos de la capa plexiforme interna, con escasa distribución horizontal. Éstas reciben información de las células bipolares, transmitiéndola a células ganglionares y a otras bipolares y amacrinas. Algunas incluso establecen interconexiones entre los sistemas ON y OFF bipolares y ganglionares. Destacan las llamadas AII que, junto con las células liberadoras de GABA, llamadas A17, forman la base del circuito de los bastones, el sistema de visión con luz débil de la retina de los mamíferos (Kolb, 2003).

Las células bipolares que reciben aferencias de bastones son únicamente del tipo ON y utilizan las células amacrinas AII y A17 como intermediarias con las células ganglionares (Kolb, 2003).

Dada su estructura anatómica, en la mayor parte de la retina la luz ha de atravesar capas de células nerviosas y sus prolongaciones antes de alcanzar los fotorreceptores. Las fibras de las capas más próximas de la retina son amielínicas y por tanto relativamente transparentes, permitiendo la llegada de la luz a los fotorreceptores sin haber sido absorbida ni demasiado distorsionada. En el centro de la fovea o foveola, estos elementos neuronales están desplazados, de forma que la luz tiene paso directo a los fotorreceptores, siendo la imagen visual en la foveola la menos distorsionada. En la parte basal de la retina se localiza la papila, donde las fibras nerviosas abandonan la retina para formar el nervio óptico. Esta zona carece de fotorreceptores, creando un punto ciego en el campo visual.

2. Estudio neurofisiológico y electrofisiológico de la retina

El estudio del sistema nervioso puede enfocarse desde múltiples puntos de vista; para entender el funcionamiento del mismo, es importante evaluar la respuesta electrofisiológica, es decir, la manifestación eléctrica medible, ante un estímulo determinado. Esta respuesta constituye lo que se denomina *potencial evocado*, ya que cuantifica los efectos eléctricos que origina (evoca) un estímulo concreto. Su obtención permite estudiar las vías sensitivas -aferentes- que siguen los estímulos empleados.

Aunque en teoría se pueden estudiar todas las modalidades sensoriales, en la práctica sólo se evalúan unas pocas. Concretamente, para el estudio de la vía visual se utiliza los *potenciales evocados visuales* (PEV), para el estudio de las vías somatosensoriales, los *potenciales evocados somatosensoriales de latencia corta* (SEP) y para el estudio de la vía auditiva, los *potenciales evocados auditivos de corta latencia* (PEACT). Por otro lado, el estudio neurofisiológico de la retina se realiza mediante el *electrorretinograma* (ERG).

2.1. Recuerdo fisiológico

2.1.1. Potencial de acción en célula aislada

La comprensión de los mecanismos de iniciación y propagación del potencial de acción en una célula excitable aislada es básica para entender los procedimientos en el electrodiagnóstico clínico (Steiss, 2003). Viene caracterizado por parámetros como:

- Amplitud.
- Duración.
- Velocidad de conducción.

La amplitud del potencial de acción de una célula aislada es del orden de microvoltios, por lo que puede no ser detectado si los electrodos de registro no están suficientemente próximos a la célula que lo genera, o la ganancia de los amplificadores es demasiado baja.

2.1.2. Potencial de acción compuesto

Por otro lado, gran parte de los estudios neurofisiológicos se basan en el registro de los cambios transmembrana de gran número de células estimuladas simultáneamente, que originan el llamado *potencial de acción compuesto* (PAC). La amplitud del potencial de acción compuesto depende del número de células que participan y de la amplitud de sus respectivos potenciales. La duración del PAC depende de la sincronía; células similares que se descargan simultáneamente producirán un PAC de breve duración, mientras que células diferentes, que se descarguen a la vez, o células similares pero que descarguen de forma desincronizada originarán un PAC de larga duración.

2.1.3. Potencial postsináptico

La sinapsis es la estructura habitual de comunicación entre dos células excitables. La acción de los neurotransmisores origina, en la membrana postsináptica, la aparición de un potencial postsináptico que puede ser excitatorio (EPSP) o inhibitorio (IPSP). Así mismo, la excitación postsináptica sobre una fibra muscular origina el llamado potencial de placa motora (EPP), que es local y no se propaga. Los potenciales postsinápticos pueden ser registrados con los electrodos adecuados, de superficie o de aguja.

El término “potencial” o “respuesta”, en neurofisiología, puede designar tanto un potencial de acción de célula aislada como un potencial de acción compuesto, e incluso la suma de potenciales de acción y potenciales postsinápticos.

2.2. Aspectos técnicos del registro de la actividad eléctrica

2.2.1. Amplificación

La escasa amplitud de las señales bioeléctricas exige la amplificación de las mismas. Este proceso se realiza normalmente mediante un *amplificador diferencial*: utiliza dos entradas (inputs), siendo la magnitud de salida (output) la diferencia entre las mismas. Normalmente, las entradas proceden de dos electrodos:

- Electrodo activo: situado cerca del origen de la actividad eléctrica a registrar.
- Electrodo de referencia: localizado en un área distante e inactiva.

De esta forma, el amplificador diferencial atenúa la actividad común en ambos electrodos, contribuyendo a eliminar el “ruido de fondo”, o actividad eléctrica no deseada.

El rango de frecuencias que puede amplificar un amplificador sin distorsión se denomina *frecuencia de respuesta*. La utilización de filtros de alta y baja frecuencia (high and low frequencies filters) permite ajustar la frecuencia de respuesta para lograr un registro óptimo, ya que atenúan e incluso suprimen el ruido indeseado de frecuencias superiores o inferiores a las que se quieren registrar. Cada tipo de técnica neurofisiológica exige la utilización de los filtros apropiados. La utilización de filtros inapropiados puede modificar la amplitud, morfología o latencia de las respuestas. De

hecho, las diferencias en la elección de estos parámetros entre los diferentes laboratorios dificulta mucho la comparación de los resultados.

2.2.2. Tipos de electrodos

La elección del tipo de electrodo a utilizar es crítica para lograr unos registros adecuados. Pueden ser de tipos muy variados:

- de superficie
- de aguja
- monopolares
- concéntricos
- bipolares
- de garaba
- electrodos tipo lentilla...

La elección de un tipo u otro viene condicionada por varios factores, como son la anatomía y las características de la señal a registrar. Asimismo, el tipo de electrodo va a condicionar dos parámetros fundamentales: el *volumen de conducción* y la *impedancia*.

Volumen de conducción.

La mayoría de los fenómenos bioeléctricos se originan lejos (far-field) del lugar donde se registran. Por tanto, debe existir una corriente eléctrica entre el generador del biopotencial y el lugar de registro, que atraviese los tejidos y fluidos que rodean al generador. El volumen de estos elementos conductores es el denominado *volumen de conducción*. La utilización de electrodos de aguja disminuye el volumen de conducción, con lo que el registro gana calidad, pero requiere la aplicación de analgesia, que puede interferir en la actividad eléctrica que se desea registrar.

Impedancia.

La interfase entre el electrodo y el tejido presenta una resistencia eléctrica; esta resistencia se denomina *impedancia*, e interfiere en la calidad del registro. Una impedancia alta puede llegar a imposibilitar la obtención de un registro útil, por lo que es importante mantenerla lo más baja posible. Debe poderse medir la impedancia de cada electrodo antes de proceder a la obtención del registro. En este sentido, es importante la elección adecuada del tipo de electrodo a utilizar, así como el uso de gel

conductor u otros medios para disminuir la impedancia y la correcta fijación del electrodo durante todo el registro.

2.2.3. Actividad eléctrica voluntaria, espontánea y evocada

La actividad bioeléctrica registrada en los tejidos puede ser *voluntaria*, *espontánea* o *evocada*. La *actividad voluntaria* se origina de forma consciente por el sujeto estudiado. La *actividad espontánea* se registra sin participación voluntaria del sujeto, y sin el empleo de estímulos externos (p.ej. el electroencefalograma). La *respuesta evocada* (o potencial evocado) representan la respuesta eléctrica a un estímulo externo, desarrollado a una intensidad y frecuencia determinada. Para obtener esta respuesta, los amplificadores son controlados por el estimulador para comenzar a registrar durante un periodo de tiempo prefijado, denominado *tiempo de análisis* (también denominado *ventana*). En ocasiones, se preestablece un tiempo de demora, tras la aplicación del estímulo, antes de comenzar a registrar la actividad eléctrica, para evitar el registro de la posible interferencia eléctrica originada por el estimulador.

2.2.4. Promedio de la señal

Muchas respuestas evocadas son extremadamente pequeñas, con una relación señal/ruido muy pobre. Para realzar el biopotencial y disminuir el ruido, se utiliza la técnica de *promedio de la señal*. Promediando electrónicamente múltiples respuestas, se aumenta la amplitud del potencial evocado, en proporción directa al número de muestras; como el ruido de fondo es aleatorio y no está relacionado con el estímulo, disminuye en proporción inversa al número de muestras promediadas.

El número de muestras a promediar depende de las características del experimento y del biopotencial a registrar, y es determinado por el investigador. Es un factor a tener en cuenta, ya que un número de muestras promediadas inadecuado puede disminuir la reproductibilidad del registro o la calidad del mismo.

2.3. Características técnicas del electroretinograma

El electroretinograma (ERG) es el registro gráfico, obtenido mediante electrodos, de la corriente eléctrica o potencial de acción desencadenado por la retina frente a un estímulo luminoso normalizado. Sirve para evaluar la integridad funcional

de la retina y, más específicamente, de los bastones, de los conos o de ambos sistemas fotorreceptores.

La respuesta eléctrica generada por el ojo a la luz como un potencial de masa (es decir, una respuesta ocular completa) puede utilizarse para valorar la función retiniana, ya sea desde un punto de vista clínico o experimental (SENFC, 2004).

2.3.1. Origen del electroretinograma

En 1865, Hölmgren (Hölmgren, 1865) demostró que al incidir la luz sobre la retina se producía una alteración del potencial eléctrico. Dewar y McKendrick registraron esta respuesta eléctrica evocada por la luz, o electroretinograma (ERG) en los seres humanos por primera vez en 1873 (Dewar and McKendrick, 1873).

Las pruebas electroretinográficas se hicieron clínicamente factibles en 1941, cuando Riggs (Riggs, 1941) descubrió que podía establecerse una conexión eléctrica estable con la córnea durante más de una hora. Para ello utilizó un electrodo de plata en forma de disco montado sobre una lente de contacto escleral. Cuando se colocaba la lente en el ojo, la plata entraba en contacto con una solución salina fisiológica situada entre ésta y la córnea. Por último se colocaba un electrodo neutro o de referencia sobre la piel de la mejilla.

La respuesta a la luz blanca del ojo adaptado a la oscuridad fue separada por Einthoven y Jolly (Einthoven and Jolly, 1908) en una onda a, una onda b, una onda c y, en algunos mamíferos, una onda d.

A partir de una serie de registros profundos con microelectrodos intrarretinianos en el gato, Brown y Wiesel encontraron una correlación entre los máximos de amplitud y las capas de la retina para las ondas a, b, y c, respectivamente (Brown and Wiesel, 1961). Posteriormente se descubrió que podía registrarse una gran onda a en el ERG de la fovea del mono, donde abundan los fotorreceptores y son escasos los restantes conglomerados nerviosos (Brown et al., 1965).

Los estudios farmacológicos en relación con el origen de la onda a del ERG no fueron posibles hasta identificar el neurotransmisor que liberaban los fotorreceptores: el glutamato. Así pues, exponiendo la retina a agonistas o antagonistas del glutamato se puede bloquear, de forma efectiva, la transmisión sináptica del fotorreceptor y, por tanto, su contribución al ERG.

Faber fue el primero en sugerir que la onda b del ERG reflejaba la actividad de las células de Müller, las células gliales más importantes de la retina (Faber, 1969). Otros estudios tienden a apoyar esta idea, ya que parece que la onda b depende del flujo de corriente a lo largo de la célula de Müller en respuesta a incrementos de la concentración del ión potasio extracelular (Dick and Miller, 1978, Yanagida and Tomita, 1982, Dick et al., 1985). Kuffer y colaboradores describieron que las células gliales del nervio óptico mostraban cambios de potencial lentos al acumularse el potasio a su alrededor durante la descarga del nervio, y que las células gliales se comportaban como un reservorio de potasio (Kuffler et al., 1966). Más recientemente, Dick y Miller en retina de anfibio (Dick and Miller, 1985) y de conejo (Dick et al., 1985), Kline en la raya (Kline et al., 1978), y otros autores, mediante electrodos sensibles al potasio, observaron dos lugares de flujo de ión potasio en respuesta a la luz: el primero en la retina distal, en la región de la capa plexiforme externa, y el segundo, más proximal, en la vecindad de las células amacrinas. La acumulación del ión potasio extracelular en la retina distal era más rápida, y de naturaleza transitoria, que en la retina proximal.

Los estudios con microelectrodos realizados por Miller en el ajolote (*Ambystoma mexicanum*) y por Newman en la rana proporcionan pruebas de que las células de Müller son el sitio de generación de las ondas b, según la teoría de Faber, constituyendo la base de “la hipótesis de las células de Müller”. Además, las formas de la onda del potencial de las células de Müller registrado intracelularmente y de la onda b del ERG registrada extracelularmente son similares, sobre todo a intensidades de estímulo bajas. La célula de Müller no genera ondas a. La latencia de la respuesta de la célula de Müller y de la onda b se corresponden estrechamente a lo largo de un amplio intervalo de intensidades de estímulo, y las relaciones entre la intensidad de los estímulos y la amplitud de las respuestas concuerdan a lo largo de un intervalo de estímulo de 5 a 6 unidades logarítmicas (Miller and Dowling, 1970, Newman, 1980).

Sin embargo, estudios posteriores realizados en relación a esta teoría, también demuestran un aumento del potasio extracelular tras exposición a la luz en las capas externa e interna de la retina, en relación a la despolarización de las neuronas retinianas, específicamente las células ON bipolares en la capa externa, y las células amacrinas junto con las células ganglionares en la capa interna (Karwoski et al., 1985, Newman, 1989). Cada vez hay más evidencias sobre cómo estas neuronas también contribuyen de

manera directa o indirecta a la génesis de la onda b del ERG (Dong and Hare, 2000, Awatramani et al., 2001).

La base fisiológica de la onda c, una respuesta lenta en relación con las ondas a y b, depende de la desaparición de iones potasio en el espacio extracelular existente entre los fotorreceptores y el epitelio pigmentario distal, en la membrana limitante externa.

2.3.2. Tipos de electroretinograma

Las pruebas de la práctica clínica habitual son el electrooculograma (EOG), el electroretinograma (ERG), el electroretinograma patrón (ERGP), el potencial evocado visual (PEV), y, más recientemente, el electroretinograma multifocal (ERGMf). También se utiliza la adaptación a la oscuridad. El ERG es un potencial complejo, que refleja cambios en la capa de células bipolares y las células de Müller, y depende de impulsos de los fotorreceptores.

Las técnicas para las pruebas electrodiagnósticas se han estandarizado recientemente, y las respuestas y los valores normales aún difieren entre los distintos laboratorios, debido a la variedad existente en cuanto a equipos y técnicas (Celesia et al., 1993).

El ERG mide el potencial retiniano frente a un destello luminoso utilizando un electrodo corneal y electrodos neutros colocados en la piel. Los electrodos suelen ser:

- a.- Un *electrodo activo*, generalmente representado por una lente de contacto escleral.
- b.- Un *electrodo de referencia* (inactivo), que se coloca en la piel.
- c.- Un *electrodo de tierra*, colocado en el centro de la cabeza.

Hay que intentar obtener el electroretinograma con anestesia tópica, incluso en los niños. La pupila debe estar bien dilatada.

Dado que se utilizan diferentes métodos para registrar el ERG, no existe una respuesta típica. No hay que olvidar que el ERG varía con la duración, la intensidad y el color del estímulo, además de depender del estado de adaptación de la retina. Suele existir una onda bifásica con una depresión negativa inicial (onda a), seguida por un pico positivo mayor (onda b) (Figura 10). Las ondas pueden ser caracterizadas por:

- Su morfología.

- Su tiempo de latencia, que se define como el tiempo, expresado en milisegundos (ms), que transcurre entre la aparición de la luz y el momento en que aparece la onda considerada.
- Su amplitud, que es la altura de la onda en relación a la onda básica. Esta amplitud es negativa o positiva y se expresa en milivoltios (mV) o microvoltios (μ V). Por convenio, la amplitud de la onda a se mide desde la línea de base hasta el vértice de la onda a, mientras que la amplitud de la onda b se mide desde el vértice de la onda a hasta el vértice de la onda b (Celesia et al., 1993).
- Su duración, expresada en ms.
- Su tiempo implícito, que es el tiempo, expresado en ms, que transcurre entre la aparición del destello luminoso y el momento en que la onda alcanza su amplitud máxima.

La importancia del ERG reside en su capacidad para diferenciar las respuestas de los conos y los bastones.

Un análisis más sofisticado del ERG muestra que, si se utiliza un estímulo realmente intenso, se produce una deflexión que precede a la onda a. Es lo que se conoce como potencial de receptor precoz (PRP) y es probable que se correlacione con cambios fotoquímicos en los fotorreceptores. También se puede observar la aparición de pequeñas oscilaciones sobre la rama ascendente de la onda b. Estos *potenciales oscilatorios* se generan probablemente en la capa nuclear interna, en las células amacrinas y en el componente OFF de las células bipolares (Wachtmeister, 1981).

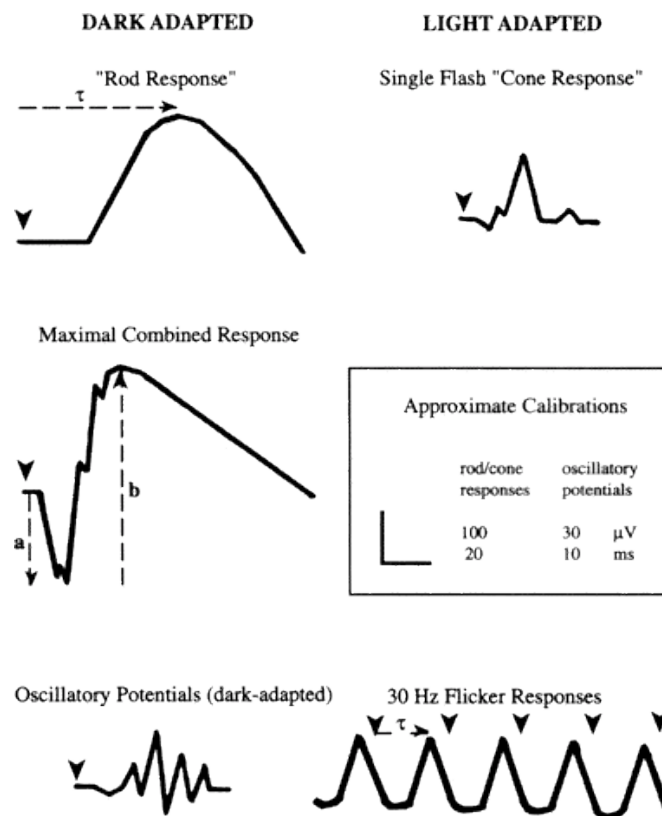


Figura 10. Registros de ERG obtenidos mediante distintas técnicas (Marmor and Zrenner, 1999).

2.4. Electrofisiología de la vía visual. Potencial evocado visual (PEV)

La llegada de un influjo nervioso aferente a las áreas corticales visuales entraña una variación de su potencial eléctrico. A esta variación de potencial se le denomina potencial evocado visual (PEV) y se puede decir que no es más que la respuesta eléctrica provocada por estimulaciones visuales de la corteza (Benítez del Castillo et al., 2002)

Esta exploración complementaria para el estudio neurofisiológico de la retina indica objetivamente el estado funcional de la vía visual, sus posibles alteraciones y los cambios evolutivos de las mismas. La estimulación se puede inducir con sensaciones luminosas (flash) o estructuradas (damero), sobre uno o ambos ojos, generándose unas ondas en la corteza visual.

2.4.1. Origen de los potenciales evocados visuales

Caton, en 1875 (Caton, 1875), fue el primer autor que, tras estímulos luminosos en el perro, publicó la aparición de modificaciones eléctricas corticales. Durante los treinta años posteriores, el registro de los potenciales cerebrales sólo se pudo realizar en animales de experimentación, ya que en el hombre, al tener que ser registrados a través del cráneo, los electrodos quedaban a gran distancia del tejido cerebral activo, por lo que las respuestas que se obtenían eran muy atenuadas.

Hans Berger (Berger, 1929) realizó el primer registro de la actividad cerebral humana, usando el término *ElectroEncefaloGramma* (EEG) para describir esta actividad cerebral. Berger identificó las diferentes actividades fisiológicas corticales y descubrió el ritmo alfa, de aspecto sinusoidal y de 8 a 13 ciclos por segundo en estado de vigilia y con los ojos cerrados, describiendo el efecto de la apertura ocular sobre la concentración de la actividad alfa o reacción de parada del ritmo alfa.

2.4.2. Tipos de potenciales evocados visuales

Los registros de los PEV, ya sean provocados por estímulos visuales lumínicos o estructurados, se representan en gráficas, donde el eje de ordenadas corresponde a la amplitud del fenómeno eléctrico, expresado en microvoltios (μV), y el eje de abcisas al tiempo de aparición del mismo, medido en milisegundo (ms). El origen del eje corresponde al momento de la presentación del estímulo. De ahí, que el tiempo que tarde en aparecer el PEV se denomine *latencia* (Benítez del Castillo et al., 2002).

Existen dos tipos de estímulos:

- a) Estímulos basados en modificaciones de luminancia, que dan origen a los PEV de flash (PEVF). Se provoca la estimulación con una fuente emisora de luz intermitente, situada frente al paciente o el animal.
- b) Estímulos basados en modificaciones del contraste: los cambios de contraste se producen sin modificación de la luminancia global y manteniéndola constante, durante el tiempo de la estimulación. Este es el tipo de estímulo que da origen a los PEV estructurados (PPEV).

2.4.3. Origen retiniano de los potenciales evocados visuales

Las células ganglionares forman la primera neurona de la vía visual, que es un sistema específico de tres neuronas. Estas células, también conocidas como células

retino-talámicas, reciben información por medio de sus dendritas y contribuyen a la elaboración del mensaje visual. A través del axón transmiten el mensaje hasta el cuerpo geniculado lateral en el tálamo. Desde el cuerpo geniculado parte el segundo tipo de neuronas, las células talamo-corticales, que forman las radiaciones ópticas y terminan en la corteza visual; éstas alcanzan el área cortical de proyección correspondiente, que es el área visual; ésta es la vía visual principal. En el cortex visual, la célula especializada es la célula piramidal y corresponde a la tercera neurona de la vía visual. El cortex visual es la zona de recepción y de integración de los fenómenos visuales, y se localiza en el lóbulo occipital (Benítez del Castillo et al., 2002).

Por tanto, la aparición de PEV significa la llegada del influjo sensorial a la corteza occipital, siendo así posible evaluar la calidad del sistema de percepción occipital y la conductividad de las vías de transmisión o vías ópticas, desde la célula ganglionar retiniana hasta la corteza occipital.

3. Alcoholismo

El consumo de bebidas alcohólicas es un hábito ampliamente extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de las sociedades occidentales. En nuestro país, el consumo de bebidas como el vino o la cerveza es un acto social, cultural y gastronómico consolidado dentro de las costumbres sociales. Sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas en España y los problemas relacionados con las mismas tienen gran importancia. Somos uno de los primeros países productores y también uno de los primeros consumidores (DGPNSD, 2010a).

El alcohol es la sustancia psicoactiva más consumida en la sociedad española y la que más problemas sanitarios y sociales ocasiona. A pesar de que el consumo de la población general está disminuyendo, muchos jóvenes tienden a beber mucho en un corto periodo de tiempo, lo que se conoce en la literatura médica como “binge drinking”. Las intoxicaciones etílicas en menores durante los fines de semana han aumentado en los últimos años. Según un estudio de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD), en 2009/10 el 78.7% de la población española entre 15 y 64 años consumió alcohol en el último año, el 63.3% lo hizo en el último mes y el 11% lo hizo a diario (DGPNSD, 2010a).

3.1. Definición

La psiquiatría clásica utilizaba el concepto de “psicosis alcohólicas” para referirse a los trastornos psicopatológicos provocados por el alcohol como factor tóxico. La conducta del bebedor alcohólico era contemplada con criterios moralistas y era considerada como un vicio o depravación ética del individuo.

A partir del siglo XIX fue apareciendo una subclase de “alcohólicos”, o en términos técnicos hoy día, personas dependientes del alcohol. Esto hizo que los profesionales de la salud empezasen a dar más importancia a la personalidad del alcohólico y a los factores motivacionales que condicionan su conducta toxicofílica.

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV), los criterios de diagnóstico para el abuso de alcohol serían: bajo rendimiento escolar o laboral por los efectos de la intoxicación por alcohol, beber en situaciones peligrosas (por ejemplo, conduciendo), tener problemas legales a causa del consumo de alcohol o continuar bebiendo aún sabiendo los problemas sociales o interpersonales que ello acarrea (por ejemplo, discusiones violentas). Si a esto se le añade la aparición de tolerancia, abstinencia o comportamiento compulsivo relacionado con la bebida, entonces se consideraría el diagnóstico de dependencia de alcohol (Pichot et al., 1995).

Por su parte, durante los últimos 30 años los científicos han puesto su atención en el problema del alcohol para descubrir sus bases, claves para el tratamiento y la prevención (Room et al., 2005).

3.2. Etiopatogenia

No existe un modelo único de personalidad sobre el que se desarrolle la conducta patológica. Las variedades de actitud que pueden llevar a la toxicofilia ética se resumen en el siguiente esquema.

- Alcohólico normativo o imitativo, que bebe influido por las presiones ambientales.
- Alcoholismo como compensación o evasiva ante determinado tipo de frustraciones o adversidades.
- Alcoholismo como auto-agresividad; la evasión en el alcohol reviste un carácter auto-destructivo.

- Impulsividad mórbida con tendencias a la búsqueda de satisfacciones inmediatas; este tipo de alcohólicos presenta rasgos propios de las personalidades psicopáticas.
- Alcoholismo secundario a las psicosis endógenas, ya se trate de esquizofrenias o depresiones endógenas con tendencia a la cronicidad.

3.3. Farmacología del etanol

El alcohol es un término general que engloba a una familia de compuestos orgánicos con propiedades comunes. Entre ellos están el etanol, metanol, isopropanol y otros. Entre las propiedades físico-químicas del etanol destaca que es un líquido claro, volátil, y fácilmente inflamable. Tiene un olor característico y es muy soluble en agua (Aragón et al., 2002). Entra dentro de la familia de los hidrocarburos. En general, y a partir de ahora, cuando se mencione alcohol se estará haciendo referencia a etanol.

3.3.1. Absorción

El alcohol se absorbe a través de todo el tracto gastrointestinal por simple difusión. La mayoría se absorbe en el intestino delgado, debido a la presencia en este órgano de microvellosidades que aumentan de forma notable la superficie de absorción y posibilitan dicha absorción. Se considera que en un individuo en ayunas el 20-30% se absorbe en el estómago, mientras que el 70-80 % lo hace en el intestino delgado.

3.3.2. Distribución

El etanol se disuelve mucho mejor en el agua que en los lípidos, y por ello, su distribución es análoga a la del agua en el cuerpo. La menor solubilidad del mismo en medios lipídicos proporciona diferencias en la distribución entre individuos con diferente proporción de grasa corporal.

3.3.3. Eliminación

La mayor parte de la eliminación del etanol (alrededor del 95%) se produce por metabolismo hepático, pero existe un escaso porcentaje que es eliminado, sin sufrir transformación alguna, a través de la orina, las heces, el sudor y el aire exhalado.

3.3.4. Metabolismo hepático del etanol

El hepatocito posee tres vías metabólicas para el etanol (Figura 11), cada una de ellas localizada en un compartimento subcelular diferente: 1) ADH (alcohol deshidrogenasa), en el citosol; 2) Sistema oxidativo microsomal, en el retículo endoplasmático liso; 3) Catalasa, en los peroxisomas. El producto metabólico de cada una de estas vías es el mismo: el acetaldehído (AcH). En cada vía, el receptor de las moléculas de hidrógeno es diferente, así como también las consecuencias metabólicas. Posteriormente, el acetaldehído es metabolizado a acetato, y éste a CO_2 y agua en los tejidos periféricos (Aragón et al., 2002).

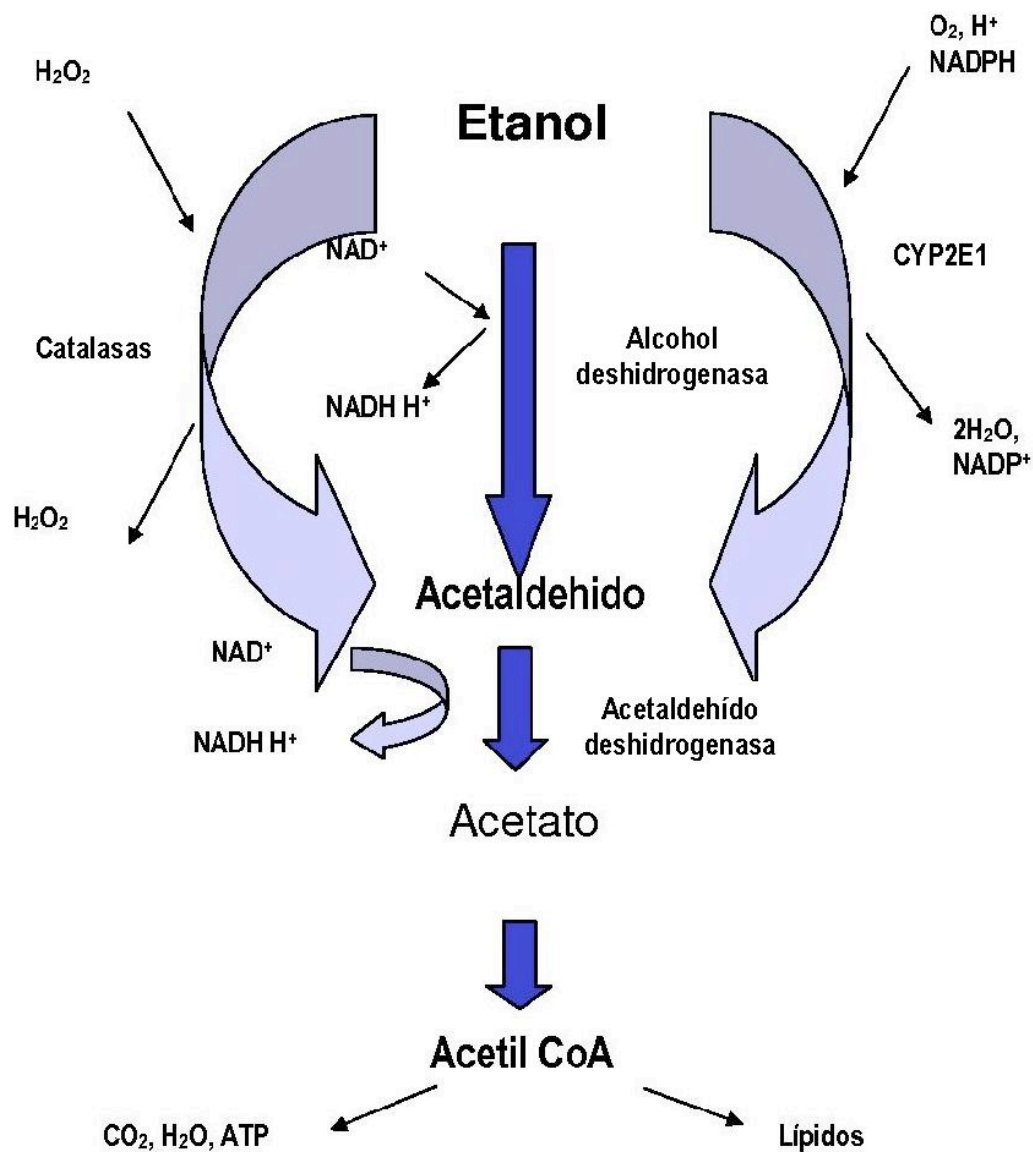


Figura 11. Esquema de las rutas metabólicas del etanol.

3.4. Efectos tóxicos del etanol

La relación entre consumo de alcohol y la salud es compleja y multidimensional y se relaciona con más de 60 enfermedades (Room et al., 2005). Se ha comprobado que el daño derivado del consumo de alcohol depende no sólo del volumen medio ingerido, sino también de las pautas de consumo. Durante la adolescencia, el consumo de alcohol se asocia con diversos efectos nocivos a corto plazo, como son los accidentes, la violencia y las intoxicaciones etílicas. A largo plazo, el consumo regular de alcohol va unido a un mayor riesgo de enfermedades crónicas graves como las complicaciones hepáticas, tumorales, neuronales y cardiovasculares (Brugal and Rodríguez-Martos, 2006).

Entre los trastornos somáticos suelen aparecer gastritis, anorexia, lengua saburral y náuseas matutinas acompañadas de pituitas viscosas o biliosas, riesgo de úlcera gastroduodenal, trastornos intestinales diversos y hepatomegalia, que se puede traducir en una esteatosis hepática. El paradigma de las lesiones orgánicas producidas por el consumo crónico del etanol es la cirrosis hepática. Aunque esta enfermedad puede ser debida a otras causas, como una infección por virus de las hepatitis B y C, desde hace años se le considera un marcador muy fiable cuando interesa evaluar y cuantificar de forma poblacional las lesiones producidas por el consumo crónico de alcohol (Parés and Caballería, 2002).

El aparato circulatorio se ve afectado en el corazón (cardiopatía alcohólica relacionada con el déficit de vitaminas B) y puede aparecer hipertensión arterial que, junto con la etiología tóxica, suele estar condicionada por trastornos emocionales. No debemos olvidar los efectos del alcohol sobre el páncreas (pancreatitis aguda y crónica), ni tampoco las enfermedades psicoorgánicas (amnesia lacunar, demencia alcohólica), los trastornos psicóticos (alucinosis, celotipia alcohólica) u otras enfermedades psiquiátricas como ansiedad y depresión, a que puede dar lugar.

En la esfera neurológica lo más característico es el temblor distal rápido y pequeño, especialmente de manos y lengua. Pueden aparecer signos o síntomas de polineuritis; abolición de reflejos aquileos, atrofia muscular, especialmente en extremidades inferiores, trastornos de la marcha y parestesias en las extremidades, además de neuritis óptica (Rozman, 1988).

El desarrollo de estas enfermedades depende en gran medida de la cantidad de alcohol consumido por los pacientes (dosis total acumulada de alcohol durante toda la vida del sujeto), aunque también influye una cierta predisposición personal (vulnerabilidad genética) y/o el concurso de determinadas circunstancias ambientales como malnutrición o infecciones concomitantes, como por ejemplo, los virus de hepatitis B y C (Parés and Caballería, 2002).

Sin embargo, consumido de forma esporádica, los efectos del etanol sobre la fisiología humana son rápidamente reversibles. Asimismo, consumido a dosis moderadas, aunque sea de forma mantenida, tampoco parece causar ninguna enfermedad, e incluso se ha sugerido que el consumo a dosis moderadas podría tener efectos beneficiosos sobre la salud (Aberg et al., 2005). De hecho, estudios realizados durante la última década en países de prácticamente todos los continentes han sugerido que el consumo de cantidades bajas y moderadas de alcohol reduce la mortalidad global, pero muy especialmente la mortalidad por causas cardiovasculares (Booyse and Parks, 2001).

3.5. Efectos del etanol sobre el ojo

3.5.1. Síndrome alcohólico fetal

Durante las últimas décadas se han realizado muchos estudios sobre los efectos adversos que tiene el consumo de alcohol sobre el ojo, aunque la mayor parte han tratado el síndrome alcohólico fetal (FAS), que consiste en una serie de desórdenes que ocurren en niños con una exposición prenatal al alcohol. Estos desórdenes se caracterizan por déficit en el crecimiento prenatal y postnatal, problemas de aprendizaje, defectos congénitos del corazón, anormalidades oculares, y defectos cráneo-faciales, algunos de los cuales se conocen desde hace tiempo (Jones and Smith, 1973).

Niños con FAS muestran una variedad de defectos oftalmológicos, que abarcan desde estrabismo, microftalmia, coloboma uveal, retina malformada, anormalidades endoteliales en la córnea, hasta otras anormalidades menores como glaucoma, cataratas (Miller et al., 1981, Miller et al., 1984, Strömmland, 1985, Chan et al., 1991, Carones et al., 1992).

La microftalmia – reducción del tamaño del ojo – se ha visto en el 90% de los niños con FAS (Strömmland and Pinazo-Duran, 2002). La microftalmia puede ocurrir

como consecuencia de un número de mecanismos potenciales, incluyendo incremento de muerte celular, reducida proliferación celular, y reducida diferenciación celular en el ojo en desarrollo (Stenkamp et al., 2002). Varios estudios en modelos animales han mostrado que el consumo materno de alcohol durante la gestación produce microftalmia en la descendencia (Parnell et al., 2006, Dlugos and Rabin, 2007, Kashyap et al., 2007).

El alcohol, como importante agente teratogénico, puede producir daños irreparables en la retina y el nervio óptico durante la ontogenia ocular, desde deterioro en la laminación de la retina neural, reducción del grosor del epitelio pigmentario, disminución en el número de fotorreceptores, hasta hipoplasia del nervio óptico (Kennedy and Elliott, 1986, Ashwell and Zhang, 1994, Chmielewski et al., 1997, Pinazo-Duran et al., 1997, Arenzana et al., 2006, Matsui et al., 2006, Tufan et al., 2006, Dlugos and Rabin, 2007, Pons et al., 2007). La hipoplasia del nervio óptico se ha visto en el 50% de los pacientes diagnosticados con FAS y es debida a un defecto en el desarrollo de las células ganglionares de la retina. La somatostatina podría influir en el desarrollo de dichas células, ya que su concentración está incrementada en la retina en desarrollo de ratas con exposición a etanol (Ferriero et al., 1992).

Un estudio en ratones (Tenkova et al., 2003) mostró que la intoxicación aguda por etanol inducía muerte celular por apoptosis en todas las células del sistema visual durante la sinaptogénesis, desde la retina hasta la corteza visual.

3.5.2. Acción del alcohol sobre el funcionamiento de la retina: ERG y PEV

Por su parte, los estudios de los posibles efectos adversos del alcohol sobre el funcionamiento del ojo en el adulto han sido mucho más escasos. La exposición aguda a etanol puede causar una pérdida en la homeostasis del calcio en el cristalino, lo que podría ser uno de los mecanismos celulares que contribuyen en el desarrollo de cataratas en individuos alcohólicos (Zeng et al., 1998). En un modelo experimental con ratas se vio que el alcohol podría modular la sensibilidad de las neuronas de la retina a GABA (Yeh and Kolb, 1997).

Debido a todos estos efectos adversos del etanol sobre el ojo en general y especialmente sobre la retina, sería fácil esperar que el consumo de alcohol desencadenara un mal funcionamiento de la retina. Por ello, durante los últimos años se han desarrollado estudios, tanto en humanos, como en modelos animales, en los que se ha evidenciado una disfunción de los fotorreceptores mediante electroretinograma

(ERG), y de las células ganglionares, detectado por potenciales evocados visuales (PEV). En cuanto al ERG, en la mayor parte de los experimentos se ha visto disminuida la amplitud de las ondas a y b, y aumentada la latencia de dichas ondas, en modelos relacionados con FAS (Katz and Foxt, 1991, Hug et al., 2000, Bilotta et al., 2002, Matsui et al., 2006), así como en animales de experimentación adultos (Pawlosky et al., 2001, Johnsen-Soriano et al., 2007b, Sancho-Tello et al., 2008). Otros estudios muestran la alteración de los PEV tras el consumo abusivo de etanol (Kelley et al., 1984, Williams, 1984, Boyes et al., 1993, Resende et al., 2001).

3.5.3. Alcohol y estrés oxidativo en el ojo

El alcohol puede ejercer una acción tóxica debido a su efecto directo en la generación de radicales libres o a través de sus metabolitos (Dupont et al., 2000), principalmente acetaldehído (Nordmann, 1994, Li et al., 2004). La ingesta crónica de etanol lleva a un incremento en los productos de peroxidación lipídica y una reducción de los factores antioxidantes (Sies, 1997) como glutatión (GSH) y sus enzimas relacionadas en diferentes tejidos como hígado (Yang et al., 2005), hipocampo (Johnsen-Soriano et al., 2007a), o testículo (Schlorff et al., 1999). Los radicales libres podrían entonces producir daños en diferentes tejidos y se piensa en la posibilidad de utilizar antioxidantes como neuroprotectores en tejidos dañados por etanol (Herrera et al., 2003).

Ya que el estrés oxidativo está incluido entre los mecanismos por los que el alcohol predispone al sistema nervioso a daño, la retina, que es el tejido neurosensorial del ojo, es particularmente sensible a radicales libres oxigenados y a peroxidación lipídica (Cervantes-Munguía et al., 2006), ya que sus membranas son extremadamente ricas en lípidos poli-insaturados. Datos publicados por nuestro laboratorio describen una reducción en el contenido de GSH así como una mayor concentración de MDA en el nervio óptico de ratas alcohólicas (Aviñó et al., 2002). Los mismos resultados se han obtenido para el homogenado de ojo y de retina, y parece existir una correlación entre los cambios en la concentración de ambas moléculas y la disminución en la amplitud de la onda b del ERG (Johnsen-Soriano et al., 2007b, Sancho-Tello et al., 2008). Algunos estudios han demostrado que el uso de antioxidantes puede prevenir el daño oxidativo producido en el ojo por el alcohol (Aquilera et al., 2005, Johnsen-Soriano et al., 2007b).

4. Consumo de Cocaína

La cocaína es un psicoestimulante y un anestésico local. Es uno de los alcaloides contenido en las hojas de la planta de la coca, que es un arbusto del género *Erythroxylum*, originario de América del Sur. Aunque existen más de doscientas especies de este género, sólo dos contienen cantidades apreciables de cocaína (*E. coca* y *E. novogranatense*).

Químicamente, la cocaína es la benzoilmetilecgonina. Es un polvo blanco de sabor amargo que provoca insensibilidad gustativa por sus propiedades anestésicas. La cocaína base es relativamente insoluble en agua, mientras que el clorhidrato de cocaína es muy soluble en este líquido lo que facilita su administración por vía intravenosa (Karch, 2002). Actualmente su uso médico es muy limitado y se utiliza esporádicamente en algunos países como anestésico tópico en cirugía ocular u ótica (O'Brien, 2006).

En 2007, se estimó que entre 16 y 21 millones de personas en todo el mundo consumieron cocaína al menos una vez, entre la población de 15 a 64 años de edad (UNODC, 2009).

En el conjunto de la Unión Europea, la cocaína es, después del cannabis, la droga ilegal de mayor consumo entre los adultos jóvenes (OEDT, 2007). Alrededor de 7,5 millones de jóvenes europeos de entre 15 y 34 años han probado cocaína en alguna ocasión. La prevalencia media para esta frecuencia de consumo, alguna vez a lo largo de la vida, se sitúa en Europa en el 5,3%. Cinco países superan esta cifra y, entre ellos, se encuentra España.

También en nuestro país, la cocaína en polvo es la segunda droga ilegal de consumo más extendido. Entre 1994 y 2004, el uso de cocaína creció de forma importante no sólo entre los adultos sino también entre los sectores más jóvenes de la población. La última Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) en 2007/2008 mostraba que el 8% de los españoles de 15 a 64 años decía haber probado alguna vez cocaína, el 3% afirmaba haber consumido esta droga alguna vez en los últimos doce meses y un 1,6% declaraba haberlo hecho en el mes previo a ser encuestado (DGPNSD, 2008). No obstante, en las dos últimas encuestas realizadas ha disminuido el número de gente que afirma haber consumido cocaína alguna vez en el

último año, siendo del 2,6% en 2009/2010 (DGPNSD, 2010a) y del 2,3 en 2011/2012 (DGPNSD, 2012).

El uso de cocaína suele iniciarse más tardíamente que el de otras drogas ilegales, como cannabis, éxtasis, alucinógenos e incluso heroína, y es, después del cannabis, la droga cuyo consumo está más extendido entre los estudiantes. Los resultados de la Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES), realizada en población de 14 a 18 años, pusieron de manifiesto que, en 2010, un 3,9% la habían consumido alguna vez en la vida, un 2,6% en el último año y un 1,5 % en el último mes (DGPNSD, 2010b).

El consumo de cocaína es, en general, de carácter esporádico y, al igual que el de otros estimulantes, está asociado a la noche, a salir de marcha, a las discotecas, al fin de semana o a días señalados (aniversarios, fin de año, fiestas locales, vacaciones, etc.). Una de las características que se atribuye a las drogas en general, y a la cocaína en particular, es facilitar la diversión, la desinhibición, la comunicación, las relaciones interpersonales, la prolongación y la intensificación de la fiesta.

En España, la cocaína se presenta principalmente en dos formas: el clorhidrato de cocaína (conocida como cocaína en polvo o cocaína) y la cocaína base (denominada base y raramente crack). En nuestro país se consume fundamentalmente cocaína en polvo por vía intranasal (esnifada), y el consumo de base es mucho menos frecuente.

La mayoría de los consumidores de cocaína usan también otras drogas, sobre todo alcohol, tabaco y cannabis, pero también anfetaminas, éxtasis y alucinógenos. En 2006, el 97,5% de los estudiantes de 14 a 18 años que habían consumido cocaína el último año, consumieron también alcohol, el 92,7% cannabis, el 44,0% anfetaminas, y el 44,3% éxtasis (DGPNSD, 2007).

4.1. Mecanismos de acción

La cocaína se une de forma específica a transportadores de dopamina, pero también de serotonina y noradrenalina, en la membrana neuronal presináptica, inhibiendo de este modo la recaptación de ciertos neurotransmisores. La concentración de dichos neurotransmisores aumenta, por tanto, en el espacio sináptico, facilitándose su unión a los receptores de la membrana neuronal postsináptica y aumentando así de forma muy intensa su acción fisiológica.

Los efectos reforzadores positivos, la euforia y la dependencia de cocaína se explican por su acción en los circuitos cerebrales de recompensa, a través del aumento de la concentración de dopamina en el núcleo accumbens y su interacción con los receptores postsinápticos.

En humanos hay una relación directa entre la tasa de ocupación del transportador de dopamina y los efectos placenteros de la cocaína (Volkow et al., 1999). La administración de dosis habituales de cocaína por vía intranasal, intravenosa o fumada, que provocan una sensación de euforia significativa, producen una ocupación del transportador de dopamina superior al 50%.

Aún así, la dopamina no explica todos los efectos reforzadores y gratificantes de la cocaína. La acción serotoninérgica parece jugar también un papel en el potencial de abuso de la cocaína (Lizasoain et al., 2001, Ramos et al., 2005).

La cocaína tiene además otras acciones en el sistema nervioso central (SNC) como la de incrementar el secuestro de dopamina en las vesículas nerviosas (Cunha-Oliveira et al., 2008), o aumentar la actividad glutamatérgica en el núcleo accumbens, el área tegmental ventral, el estriado y la corteza prefrontal (Kalivas and Duffy, 1998). Además se sabe que la cocaína provoca un descenso del tono inhibitorio GABAérgico (Gasior et al., 2004, Tseng and O'Donnell, 2004).

La cocaína es además un anestésico local del tipo éster como la tetracaína, benzocaína y procaína. Bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje y al impedir su entrada, en respuesta a la despolarización, se produce una alteración de la conducción nerviosa. Estos efectos explican algunas de las complicaciones cardíacas de la cocaína.

En estudios de neuroimagen cerebral se ha demostrado que la cocaína reduce el flujo sanguíneo cerebral, especialmente en zonas ricas en dopamina del hemisferio izquierdo. Esta reducción del flujo cerebral se relaciona con los efectos placenteros de la cocaína y la duración de los mismos (O'Brien, 2006).

4.2. Etiopatogenia de la adicción a cocaína

La adicción a estimulantes como la cocaína o anfetamina es un desorden psiquiátrico difícil de tratar. Se caracteriza por una alta tasa de recaída que puede ocurrir después de muchos meses o algunos años de abstinencia. Años de observaciones de adictos a las drogas han mostrado que una dependencia química, incluyendo una

dependencia a estimulantes, está asociada a una variedad de desórdenes psiquiátricos y neurológicos coexistentes.

El principal factor etiológico parece ser el propio efecto biológico del consumo agudo de cocaína; por ello, la exposición y la disponibilidad de consumo, la dosis, la duración y la ruta de administración de la cocaína son fundamentales en el desarrollo de esta adicción (Platt, 1997). Mayores cantidades y vías más rápidas son más adictivas. La cocaína produce una secuencia alternativa de efectos positivos (euforia) y negativos (apetencia y abstinencia motivacional), que tiende a perpetuar el consumo (Dackis and O'Brien, 2001). La acción que ejerce la cocaína sobre la unión dopaminérgica del núcleo accumbens, otras regiones mesolímbicas y mesocorticales y corteza prefrontal (Koob, 1999), media de manera crítica los efectos adictivos. Estudios recientes con diversas técnicas de neuroimagen han comprobado esta hipótesis (Bolla et al., 1998, Volkow et al., 1999) y han localizado en la amígdala, en el giro cingulado anterior, en el corteza prefrontal dorsolateral y en el cerebelo, las alteraciones más características de la dependencia de cocaína (Childress et al., 1999, Garavan et al., 2000, Romero et al., 2010).

Todas estas estructuras están vinculadas a la memoria, al aprendizaje, al placer, a la motivación y a las funciones ejecutivas humanas (LeDoux, 2000). La taquifilaxia (o tolerancia aguda) y la acción sobre otros receptores parecen también factores importantes, pero no se conoce claramente su papel en la adicción de cocaína (Sora et al., 2001).

El consumo crónico de cocaína produce cambios neurofisiológicos en los sistemas cerebrales que regulan las experiencias placenteras, la conducta hedónica (Bolla et al., 1998) y la motivación, y dan soporte a las conductas básicas de supervivencia y reproducción. El conocimiento de cómo la cocaína produce una profunda alteración en las conductas instintivas ha resultado clave en la comprensión científica de la motivación y del placer en los humanos. La hipótesis de la depleción de DA sugiere que el estímulo repetido por cocaína y el bloqueo subsiguiente de la recaptación conduce a un agotamiento de los depósitos de DA presinápticos y a la hipofunción dopaminérgica (Repetto and Gold, 2005). Esta hipótesis tiene múltiples apoyos pero, hasta la fecha, no se ha comprobado completamente. En estudios animales se han descrito alteraciones de los autoceptores dopaminérgicos inhibitorios (Weiss et al., 2001b) y una disminución de la disponibilidad de serotonina en las sinapsis

(Jacobsen et al., 2000), producidos por consumo crónico de cocaína, que podrían estar en la base de la anhedonia (incapacidad de experimentar placer) y de la abstinencia motivacional (Koob and Nestler, 1997) observada en muchos cocainómanos (Weiss et al., 2001a). En otros estudios se ha mostrado la implicación de otros neurotransmisores ((Hemby, 1999)), de proteínas celulares (por ejemplo, sintetasas del segundo mensajero), de la proteína G, proteinkinasa, modificaciones de la expresión génica (que determina la configuración específica de la plasticidad molecular y conductual) y neurotoxicidad (Nestler, 2001).

Algunos autores han asociado la adicción a cocaína a rasgos de personalidad como la impulsividad, la búsqueda de sensaciones, la tendencia a ignorar el riesgo o la hipertimia. Aunque estas afirmaciones serían suscritas por muchos clínicos, no se conocen científicamente las características de las posibles personalidades cocainogénicas ni, incluso, si existen como tales. La asociación de la cocainomanía con rasgos de personalidad límite, hipertimia o psicopática es muy frecuente en la clínica, pero hay que determinar siempre si estos rasgos son previos (primarios) o posteriores (secundarios) al consumo de cocaína.

Tienen importancia en muchos casos los hábitos específicamente asociados al riesgo de consumir y el desconocimiento o la negligencia de que se sufre una adicción (por falta de información y/o afectación selectiva del recuerdo de las conductas anómalas que ocurren al consumir). En muchos momentos históricos, la cocaína se ha asociado a estatus y nivel sociocultural y ello ha acercado a consumir a grupos específicos de población (aunque, regularmente, el consumo ha caído después en descrédito por los problemas que acarrea).

En resumen, la apetencia o «craving», la falta de motivación para la abstinencia, la negación de la enfermedad y el incumplimiento terapéutico que caracterizan a la cocainomanía tienen un soporte biológico que se conoce cada vez mejor y su consideración es imprescindible para la indicación y aplicación exitosa de los tratamientos biológicos y psicosociales.

4.3. Farmacología de la cocaína

4.3.1. Absorción

Fumada o administrada por vía intravenosa produce sus efectos en segundos y alcanza las concentraciones plasmáticas máximas a los pocos segundos o minutos. Es importante recordar que la administración intrapulmonar, en forma de inhalación o fumada, produce efectos incluso más intensos y más rápidos que la vía intravenosa y por ello mayor compulsión al consumo, lo que genera un elevado potencial adictivo.

Por vía intranasal el efecto máximo aparece a los 15-30 minutos y alcanza su concentración máxima a los 30-45 minutos.

La absorción oral es baja (30%), deben administrarse dosis elevadas por esta vía para obtener efectos perceptibles. En los países andinos, los masticadores habituales de coca consumen unos 12-15 gramos de hojas tres o cuatro veces al día. Considerando una pureza del 0,5%, la cantidad de cocaína consumida en cada ocasión es de unos 75 mg. El té de coca contiene aproximadamente 1 gramo de hojas secas y unos 5-6 mg de cocaína y cantidades variables de otros alcaloides (benzoilecgonina y ecgonina metilester).

4.3.2. Distribución

La cocaína se reparte ampliamente en el organismo, atraviesa la barrera placentaria y la hematoencefálica hacia el sistema nervioso central, donde produce gran parte de sus efectos. También se encuentra en saliva y sudor, por lo que su identificación en estos fluidos resulta útil para finalidades médico toxicológicas.

4.3.3. Metabolismo

En ausencia de alcohol los principales metabolitos de la cocaína son la benzoilecgonina (BE, 45%) y la ecgonina metil ester (EME, 50%), ambos inactivos. El metabolismo hacia EME se debe a la actuación de esterasas hepáticas y plasmáticas (pseudocolinesterasa). La BE se forma por hidrólisis espontánea y por una carboxilesterasa hepática. Las concentraciones de norcocaína, un metabolito activo formado por metabolismo hepático por el citocromo P-450 3A4 son muy pequeñas (5%) (Farré et al., 1993, Farré et al., 1997).

En presencia de alcohol, la carboxilesterasa hepática transforma la cocaína en cocaetileno (benzoiletilcocaína), que posee una actividad farmacológica similar a la

cocaína. Las concentraciones de cocaetileno en estos casos pueden llegar a ser hasta un 20% de las totales.

4.3.4. Eliminación

Tan sólo un 1-5% de la cocaína consumida es eliminada sin ser transformada en orina siendo la presencia de los metabolitos BE y EME mayoritarios en la misma. Tras una dosis de cocaína se puede detectar BE durante 48-72 horas y en el caso de consumidores crónicos la orina puede ser positiva a este metabolito durante una semana. La semivida de eliminación de la cocaína es de 0.5-1.5 h, la de BE es de 6-8 h y la de la EME es de 3-8 h. La metilecgonidina (anhidroecgonina metil ester, AEME) es un metabolito urinario que únicamente se forma cuando la cocaína es fumada (Camí et al., 1998).

4.4. Efectos tóxicos de la cocaína

La toxicidad de la cocaína se manifiesta de muchas maneras en el organismo, aunque los cambios más dramáticos se observan en el sistema cardiovascular, hígado y cerebro.

En el sistema cardiovascular se consideran típicas complicaciones de abusadores de cocaína: taquicardia, hipertensión, ruptura de vasos sanguíneos, arritmias, lesiones arterioscleróticas, que a menudo preceden a isquemia de miocardio o infarto (Karch, 1993).

La cocaína parece ser hepatotóxica en humanos (Marks and Chapple, 1967), y en animales (Thompson et al., 1979, Mehanny and Abdel-Rahman, 1991). Esta hepatotoxicidad está potenciada por drogas como los barbitúricos, alcohol, y cocaína adulterantes.

La cocaína también induce desórdenes pulmonares, que son particularmente severos en fumadores de cocaína. Estos desórdenes incluyen: barotrauma, inflamación e infección de pulmones, congestión pulmonar, edema, hipertrofia de las arterias pulmonares y necrosis pulmonar (Karch, 1993).

La toxicidad sistémica de cocaína podría contribuir indirectamente a desórdenes psiquiátricos resultado de un abuso crónico a cocaína, entre los que se incluirían ansiedad, agitación psicomotora, agresividad, ideación paranoide, delirio y alucinaciones, insomnio y conducta estereotipada.

Investigaciones realizadas en animales y estudios clínicos demuestran que el uso de cocaína de forma crónica puede producir serias neuropatías. En humanos puede causar apoplejía, neuropatía óptica, infarto cerebral, hemorragia subaracnoidea e intracerebral, isquemia cerebral multifocal, atrofia cerebral e infarto de miocardio llevando a una isquemia cerebral y a un edema. (Lathers et al., 1988, Klonoff et al., 1989, Daras et al., 1991, Fredericks et al., 1991), además de una gran cantidad de desórdenes en el flujo sanguíneo cerebral (Volkow et al., 1988, Holman et al., 1993, Strickland et al., 1993, Rinder et al., 1994, Kosten et al., 1996).

Otros efectos indeseables de la cocaína son dilatación pupilar o midriasis, sudoración, temblor, aumento de la temperatura corporal, náuseas o vómitos y rechinar de dientes o bruxismo.

Algunas complicaciones están vinculadas a la vía de administración utilizada. Así, por vía intranasal puede provocar sinusitis, rinitis, hemorragias nasales, atrofia mucosa nasal y perforación del tabique nasal. Por vía intravenosa puede producir, más por la vía utilizada que como causa etiológica, hepatitis B y C, SIDA, endocarditis, infecciones cutáneas, abscesos, neumonía y sepsis. Por vía fumada induce hemoptisis, neumonías, asma, dolor torácico, quemaduras e irritación ocular.

4.5. Efectos de la cocaína sobre el ojo

El consumo de cocaína durante la gestación se ha asociado con anormalidades en el sistema visual en desarrollo. Por ejemplo, la exposición a cocaína durante este período hace más susceptibles a los niños a desarrollar estrabismo (Block et al., 1997). Uno de los aspectos más afectados por la cocaína en el ojo es el sistema vascular, ya que produce edema en los párpados, además de hemorragia en la retina relacionada con isquemia (Good et al., 1992, Silvia-Araújo et al., 1994, Silvia-Araújo and Tavares, 1996, Silvia-Araújo et al., 1996, Méndez-Armenta et al., 1997). Durante este período de gestación también se han visto daños en los fotorreceptores de la retina (Silvia-Araújo et al., 1995a) y en la capa de células ganglionares (Silvia-Araújo et al., 1993, Silvia-Araújo et al., 1995b, Méndez-Armenta et al., 1997), así como anormalidades en el nervio óptico (Good et al., 1992, Silvia-Araújo et al., 1993).

En cuanto al consumo de cocaína en adultos, se han recogido varios casos clínicos en los que el sistema vascular de la retina también está afectado, pues se observa una oclusión tanto de la arteria como de la vena central de la retina (Devenyi et

al., 1988, Sleiman et al., 1994, Michaelides and Larkin, 2002, Leung et al., 2008). Recientemente se ha descrito el primer caso clínico de maculopatía bilateral ocurrido tras un consumo prolongado de cocaína intranasal (Ascaso et al., 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, el principal efecto reforzante de la cocaína es la alteración de la neurotransmisión dopaminérgica en el sistema de refuerzo del cerebro. Ya que la DA se encuentra en altas concentraciones en la retina, se podría pensar que la dependencia a cocaína podría estar asociada con anomalías en el electroretinograma. Roy y colaboradores (Roy et al., 1996, Roy et al., 1997) vieron que la amplitud de la onda b del electroretinograma estaba disminuida en pacientes dependientes de cocaína tras su retirada. Para comprobar el planteamiento anterior, realizaron nuevos estudios, en los que se les hacía un test de craving de cocaína a los pacientes antes del ERG. Se vio que pacientes con mayor cambio en el ERG podrían ser más vulnerables a craving de cocaína (Smelson et al., 1998, Smelson et al., 2001).

5. Fisiología del estrés oxidativo

5.1. Estrés Oxidativo. Radicales libres

5.1.1. Papel fisiológico y patológico

Se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Satriano et al., 1993, Zimmerman et al., 2002, Hardy and Hunt, 2004). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas (Fillebeen and Pantopoulos, 2002, Sindhu et al., 2005) y contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon et al., 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Buttke and Sandstrom, 1994, Svensk et al., 2004).

Los radicales libres pueden relacionarse con la hipertensión (Touyz, 2004), la disfunción cardiovascular (Ramachandran et al., 2003), la inflamación (Telfer and Brock, 2004) y con enfermedades como la diabetes (Hermenegildo et al., 1993, Miranda et al., 2004), el SIDA (Hsu et al., 2003), la epilepsia (Patel, 2004), etc.

Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones), los lípidos de

membrana (provocando su peroxidación) o las proteínas (alterando actividades enzimáticas).

5.1.2. Generación de radicales libres

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas and Blattna, 1986).
2. Excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig and Babior, 1979).
3. Activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard et al., 1994).
4. Deslocalización de metales de transición (Fe^{2+} y Cu^{+}) de sus sitios de depósito (Halliwell and Gutteridge, 1986).
5. Hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers et al., 1985).
6. Activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Beckman et al., 1990).
7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).
2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorios (Halliwell and Gutteridge, 1986).
3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).
4. Exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusión (McCord and Roy, 1982).

5.1.3. Peroxidación lipídica

Consiste en el deterioro oxidativo de grasas, oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos insaturados. El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es un radical libre de vida media muy corta, que se forma al romperse la molécula de agua. La peroxidación lipídica ocurre cuando este $\cdot\text{OH}$ es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico.

Un $\cdot\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación.

La peroxidación de lípidos es un fenómeno que puede conducir a la muerte celular, pero también puede inducir la formación de intermediarios derivados de los lípidos. Entre los productos de la peroxidación lipídica se incluyen una serie de aldehídos que actúan como “mensajeros tóxicos secundarios”, modificando la acción de los radicales libres iniciales, ya que, al contrario que éstos, poseen una vida media mucho mayor y pueden por tanto difundir desde su lugar de producción, alcanzando células o tejidos situados a cierta distancia.

5.2. Defensa Antioxidante

5.2.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell and Gutteridge, 1989). El término “sustrato oxidable” incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes, proporcionados o no por la dieta (vitaminas C y E, glutatión, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies and de Groot, 1992).

5.2.2. El sistema glutatión

Se denomina sistema glutatión al conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionadas con su metabolismo, que son además responsables del

mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister and Anderson, 1983). El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister and Anderson, 1983). Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar en función de su protección frente a la toxicidad del oxígeno (Fahey et al., 1987). Se considera estado del glutatión (GSH) al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower and Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El término estado no implica unos valores constantes para el glutatión, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema. El glutatión está relacionado con la actividad de algunas enzimas como:

A. **Actividad peroxidasa** representada por tres enzimas:

1. Glutatión peroxidasa (GPx): es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de esta enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutatión peroxidasa. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de ésta (Van Vleet et al., 1981).
2. Glutatión transferasa con acción peroxidasa: algunas isoenzimas de la glutatión S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutatión peroxidasa esta disminuida mientras que la actividad glutatión transferasa esta aumentada (Scharmm et al., 1985).

3. **Glutación peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados:** actúa sobre fosfolípidos oxidados de membranas biológicas. Esta enzima es una glutación peroxidasa de fosfolípidos hidroperóxidos, llamada PHGPx. Es un monómero y ha sido descubierto como una seleno enzima distinta de la clásica glutación peroxidasa basándose en su ADNc y secuencia aminoácida (Ursini et al., 1982).
- B. **Actividad glutación disulfuro reductasa:** el glutación disulfuro (GSSG) formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutación reductasa. Por tanto esta enzima mantiene el estado reducido del glutación, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.
- C. **Actividad gamma glutamil transpeptidasa:** es una enzima del catabolismo del glutación que cataliza la transferencia del grupo gamma glutamilo. Normalmente está asociada a la membrana celular y orientada con su sitio activado hacia el exterior. Constituye el paso extracelular del ciclo gamma-glutamilo (Meister and Anderson, 1983).

Además del glutación existe una gran batería de compuestos biológicos encargados del mantenimiento del equilibrio redox en el organismo. Entre ellos destacan la vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y el ácido lipóico. Otros como la ubiquinona y los carotenoides tienen variado interés dependiendo del medio en cuestión.

6. La naltrexona y el alcoholismo

6.1. Mecanismos de acción del alcohol en el sistema de refuerzo del cerebro

El conocer los mecanismos de acción del alcohol es fundamental para comprender la razón por la cual la gente bebe repetidamente a pesar de las consecuencias adversas que esto tiene.

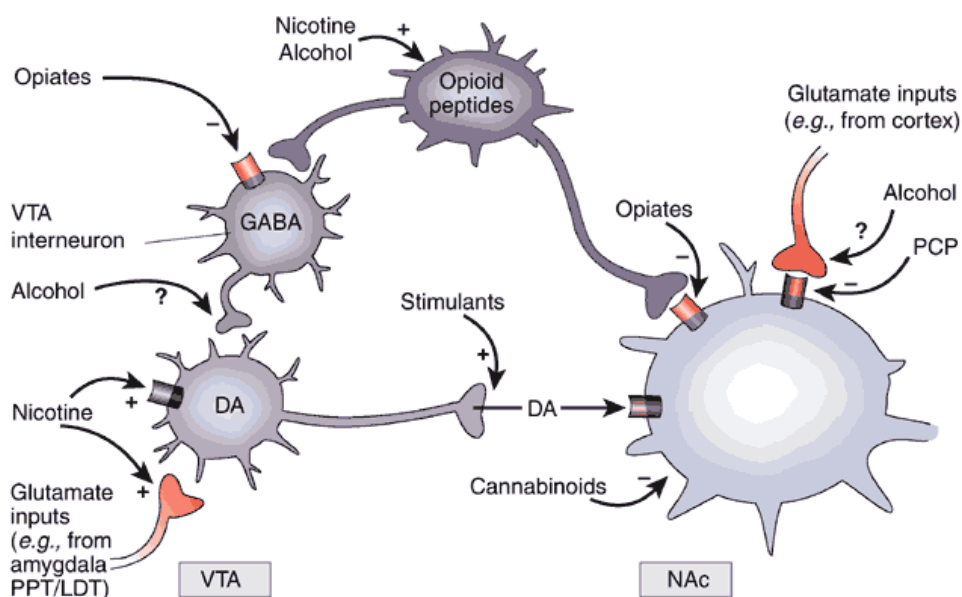
El alcohol tiene efectos sobre diversos sistemas de neurotransmisión, como el del ácido γ -aminobutírico (GABA), la dopamina, los opioides y la serotonina, y en años recientes se han incorporado datos de su interacción con el glutamato. En el cerebro, el

alcohol actúa sobre estructuras y sistemas relacionados con sensaciones placenteras (sistema dopaminérgico mesolímbico-cortical), lo que le confiere propiedades con potencial adictivo.

Las β -endorfinas en el área tegmental ventral (ATV) actúan inhibiendo la actividad de las neuronas GABAérgicas, lo que, a su vez, reduce la acción inhibitoria que en estado normal produce GABA sobre las neuronas dopaminérgicas de este área, incrementando así la liberación de dopamina en las terminales que proyectan tanto a la corteza prefrontal como al núcleo accumbens (vía mesolímbico-cortical) (Figura 12) (Di Chiara and Imperato, 1988). Resulta bien conocido que una gran variedad de drogas de abuso con mecanismos celulares diferentes actúan sobre esta vía mesolímbico-cortical, entre otras, el alcohol (Wise and Bozarth, 1987, Weiss and Porrino, 2002, Koob, 2003, Juárez, 2004).

Si consideramos que el alcohol provoca la liberación de opioides endógenos como las β -endorfinas (Burov et al., 1984, Gianoulakis, 1990, Gianoulakis et al., 1996, Zalewska-Kaszubska et al., 2006), y que varias estructuras relacionadas con mecanismos de reforzamiento, como el núcleo accumbens, tienen receptores opioides, parte del efecto gratificante del alcohol puede ser mediado por una acción directa de las β -endorfinas sobre estas estructuras, además de su acción facilitadora en la liberación de dopamina desde el ATV.

Por otra parte, se han observado niveles altos de β -endorfinas en sujetos de familias con historia de alto riesgo de alcoholismo después de un consumo de alcohol (Gianoulakis et al., 1996), así como en ratas con preferencia a alcohol (Zalewska-Kaszubska et al., 2006), y se ha postulado que la deficiencia de β -endorfinas durante el período de abstinencia puede contribuir a la generación de ansiedad y a la búsqueda del consumo de alcohol, ya que se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles de β -endorfinas y la ansiedad durante este período (Kiefer et al., 2002).



Ann Thomson

Figura 12. Rutas moleculares de sustancias adictivas ((Nestler, 2005)).

6.2. Naltrexona como antagonista de receptores mu opioides

La naltrexona (Figura 13) es un antagonista opiáceo, ya que se une competitivamente a sus receptores, localizados principalmente en el sistema nervioso central y periférico. De este modo, antagoniza las acciones tanto de los opiáceos endógenos (endorfinas) como de los opiáceos de administración exógena.

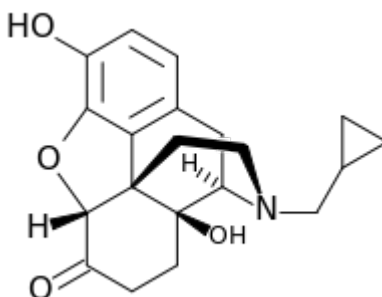


Figura 13. Fórmula de la naltrexona.

La naltrexona tiene una duración de acción de 1-2 horas al ser administrada por vía intravenosa, aunque también está disponible para ser administrada por vía oral. Este compuesto es muy utilizado en el tratamiento de la intoxicación aguda por opiáceos (como la codeína, morfina y la heroína). Tiene una vida media de 10 horas y una dosis oral única de 100 mg es capaz de bloquear hasta durante 48 horas los efectos de la

heroína inyectada. Por lo general, la naltrexona se toma una vez al día en una dosis de 50 mg o en dosis de 100-150 mg tres veces por semana.

La naltrexona es un agente que bloquea receptores opioides, particularmente (pero no exclusivamente) el receptor μ -opioide (Verebey and Mulé, 1975, Anton et al., 2006). Existen altas concentraciones de receptores μ -opioides en áreas del cerebro, como el núcleo accumbens, amígdala, giro cingulado, y ganglio basal (Zubieta et al., 1999), que han sido implicados en la ruta de refuerzo asociado con el abuso de alcohol y otras sustancias. La ocupación de estos receptores está relacionada con el craving de alcohol (Bencherif et al., 2004).

El uso de este agente en modelos animales lleva a una reducción de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens (Benjamin et al., 1993, Gonzales and Weiss, 1998, Middaugh et al., 2003). Disminuye los efectos reforzantes del alcohol por dos mecanismos: (1) suprimiendo la estimulación beta-endorfina mediada por alcohol de las neuronas dopamina directamente en el núcleo accumbens, y (2) reduciendo la desinhibición beta-endorfina de la inhibición tónica de las células dopamina por neuronas ácido gamma-aminobutírico en el área tegmental ventral (Spanagel and Zieglgänsberger, 1997, Johnson and Ait-Daoud, 2000).

Ya que las propiedades farmacocinéticas de la naltrexona oral llevan a fluctuaciones significativas en los niveles plasmáticos con dosis diaria oral, su efectividad general está limitada por dos factores. Primero, el bajo nivel en plasma de naltrexona oral disminuye su eficacia, lo que podría explicar por qué por encima del 85% de la medicación es requerida con el fin de tener una respuesta terapéutica (Volpicelli et al., 1997). Segundo, picos altos son considerados responsables de efectos adversos (Croop et al., 1997, King et al., 1997), y aproximadamente al 15% de los pacientes con naltrexona oral se les retira el tratamiento a causa de dichos efectos, especialmente náuseas (Croop et al., 1997). Además, sujetos con alelo Asp40 del receptor μ -opioide, al contrario de aquellos con tipo alélico Asn40, podrían tener un mayor beneficio terapéutico que el observado en la respuesta promedio (Oslin et al., 2003).

6.3. Naltrexona en la dependencia a alcohol

La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado varios medicamentos para el tratamiento de la dependencia a alcohol, incluyendo disulfiram, acamprosato y

naltrexona. En la adicción, se ha mostrado que el topiramato es potencialmente efectivo, aunque no ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de dependencia a alcohol.

Se han realizado muchos estudios en las últimas décadas que proponen a la naltrexona como una potencial farmacoterapia para el tratamiento de alcoholismo crónico debido a su capacidad de bloquear los receptores opioides. El bloqueo de dichos receptores por parte de la naltrexona hace que el fármaco sea también activo en el bloqueo de los efectos euforizantes derivados del consumo del alcohol, lo que explica que tras su administración se observe una reducción del craving y una tasa de recaída significativamente menor, tanto en animales (Middaugh et al., 2003, Ji et al., 2008); (Altshuler et al., 1980, Walker and Koob, 2008), como en pacientes abstinentes (O'Malley et al., 1992, Volpicelli et al., 1992, Swift et al., 1994, Davidson et al., 1996, Anton et al., 1999, Davidson et al., 1999, O'Malley et al., 2002, Anton et al., 2004, Drobos et al., 2004, Schmitz et al., 2004, Srisurapanont and Jarusuraisin, 2005, Heiling and Egli, 2006, Myrick et al., 2008, Kranzler et al., 2009). Estos datos sugieren que el bloqueo de receptores opioides con naltrexona podría ser un tratamiento para reducir el uso de alcohol (reduciendo el refuerzo y placer de la bebida) y mantener la abstinencia (reduciendo el craving inducido por estímulos ambientales). Recientemente se ha visto que la naltrexona podría ser eficaz en el tratamiento de alcoholismo incluso en pacientes con desórdenes bipolares (Sherwood Brown et al., 2009).

La naltrexona es capaz de bloquear el desarrollo de preferencia para una dieta de azúcar (Levine et al., 2002) y el consumo de solución de sacarina (Goodwin et al., 2001). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que el bloqueo de receptores opioides por naltrexona a dosis mayores bloquea los efectos reforzantes positivos tanto de reforzadores naturales, como drogas.

En resumen, muchos estudios han demostrado la efectividad de la naltrexona para el tratamiento de la dependencia a alcohol. No obstante, no todas las personas responden de igual manera ante el tratamiento con naltrexona, unos alcohólicos lo hacen muy bien, mientras que otros no lo hacen. Un estudio más reciente mostró que el tratamiento con naltrexona no fue eficaz para mantener la abstinencia en una población de americanos de origen africano (Ray and Oslin, 2009). Existe una serie de características fenotípicas de individuos dependientes de alcohol que podrían estar asociadas con una mejor respuesta, incluyendo nivel de craving, función cognitiva, historia familiar y sexo (Jaffe et al., 1996, Monterosso et al., 2001, O'Malley et al.,

2002, Garbutt et al., 2005, Rubio et al., 2005), así como la sustitución del amino ácido asparragina a aspartato en el receptor μ -opioide tipo 1 (OPRM1) en la posición 40 (Anton et al., 2008). Por tanto, serán necesarios más estudios farmacogenéticos.

7. El topiramato y la adicción a cocaína

7.1. Topiramato

El topiramato (Topamax®) es un fármaco antiepiléptico, derivado del monosacárido D-fructosa (Figura 14) (Maryanoff et al., 1987), introducido en Europa en 1995 para el tratamiento de cuadros epilépticos de difícil control. Es absorbido en 1-4 horas, su biodisponibilidad oral está sobre el 80% y su unión a proteínas plasmáticas es del 15%. Su perfil farmacocinético es lineal en relación a la dosis (Schneiderman, 1998). No afecta a las enzimas hepáticas, es excretado inalterado en la orina, y tiene un alto índice terapéutico (Doose et al., 1996).

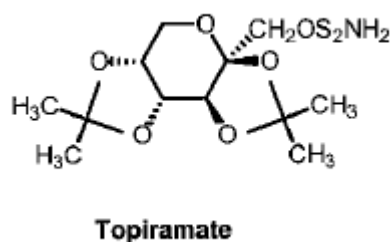


Figura 14. Fórmula del topiramato.

7.2. Mecanismo de acción del topiramato

Como muchas drogas anticonvulsiones, el topiramato tiene múltiples mecanismos de acción (Hilton et al., 2004, Rogawski and Löscher, 2004, Czapinski et al., 2005, Dickenson and Ghandehari, 2007, Landmark, 2007, Gass and Olive, 2008). El topiramato podría incrementar las concentraciones GABA cerebrales en humanos (Kuzniecky et al., 1998, Petroff et al., 1999), potenciando la transmisión GABAérgica inhibitoria por unión a receptores GABA alostéricos, probablemente a través de un mecanismo no benzodiazepina y de sistemas mensajeros secundarios (White et al., 1997, Gordey et al., 2000, White et al., 2000). El topiramato también podría inhibir la salida de glutamato, bloqueando receptores AMPA/kainate GluR5 (Severt et al., 1995,

Gryder and Rogawski, 2003, Kaminski et al., 2004), y podría inhibir la actividad neuronal de canales Na^+ y Ca^{2+} sensibles al voltaje (Coulter et al., 1993, Gibbs et al., 2000, White, 2005).

7.3. Usos terapéuticos del topiramato

El topiramato ha sido utilizado durante la última década para el tratamiento de ataques epilépticos (Privitera, 1997). Ha sido aprobado más recientemente para el tratamiento de migraña (Brandes, 2005, Brown et al., 2005, Bussone et al., 2005, Campistol et al., 2005, D'Amico et al., 2005, Diamond et al., 2005, White, 2005). Actualmente sus indicaciones han aumentando, prescribiéndose para desórdenes alimenticios (Hedges et al., 2003, Winkelman, 2003, De Bernardi et al., 2005) y para el tratamiento de obesidad (Wilding, 2004, Ioannides-Demos et al., 2005, Kaplan, 2005). Así mismo, el topiramato ha sido prescrito en ocasiones para el tratamiento de diversos desórdenes psiquiátricos, como desorden bipolar, desorden de estrés postraumático, esquizofrenia, etc. (Fhager et al., 2003, Gatto et al., 2003, Janowsky et al., 2003, Arnone, 2005, Nickel et al., 2005, Tiihonen et al., 2005).

Una sobredosis de cocaína accidental, masiva, así como su uso recreativo a dosis relativamente bajas, podría producir ataques epilépticos (Kramer et al., 1990, Dhuna et al., 1991, Scharank, 1992). Gasior y colaboradores (Gasior et al., 1999), probaron la capacidad de 14 compuestos antiepilépticos para proteger a ratas tratadas con una dosis de cocaína, produciendo todos ellos defectos motores en los animales. Uno de esos compuestos fue el topiramato, que fue capaz de proteger a los animales de ataques epilépticos inducidos por la cocaína.

7.4. El topiramato en la adicción

En los últimos años se ha visto que el topiramato podría ser un nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la adicción a drogas, dado que es capaz de atenuar los síntomas somáticos de la retirada de varias drogas de abuso (Zullino et al., 2004, Krupitsky et al., 2007).

El craving que aparece durante el tratamiento de diferentes adicciones es una de las situaciones más difíciles de tratar (Larimer et al., 1999, Tiffany, 1999, George et al., 2001). El incremento del movimiento GABA en varias regiones del cerebro de

pacientes tratados con topiramato, así como su efecto sobre el sistema glutamatérgico, podrían ser útiles en el tratamiento del craving en pacientes con dependencia a sustancias después de la fase de detoxificación física.

Varias pruebas clínicas recientes han demostrado la eficacia del topiramato en la atenuación del craving de alcohol y su consumo (Rubio et al., 2002, Anderson and Oliver, 2003, Johnson et al., 2003, Komanduri, 2003, Johnson et al., 2004, Rubio et al., 2004, Johnson, 2005, Kenna et al., 2007) y su utilidad para la retirada de opioides (Zullino et al., 2002, Zullino et al., 2004). Igualmente, se ha mostrado que el topiramato promueve la abstinencia de nicotina (Johnson et al., 2005, Khazaal et al., 2006, Kenna et al., 2007, Baltieri et al., 2009) y MDMA (Akhondzadeh and Hampa, 2005).

En lo que a la cocaína se refiere, aunque no hay farmacoterapias aprobadas para la adicción a cocaína, se han propuesto una serie de medicaciones con algunos resultados prometedores, incluyendo agentes dopaminérgicos (disulfiram, amantadine) y GABAérgicos (lamotrigine, tiagabine, topiramato), antagonistas adrenoceptores (propranolol), agonistas del receptor GABA (bachofen) vasodilatadores e inmunoterapias. De hecho, existe una serie de casos publicados que proponen al topiramato como un eficaz tratamiento para la dependencia a cocaína (Bobes et al., 2004, Kampman et al., 2004, Johnson, 2005, Sofuoglu and Kosten, 2005, 2006, Wiesbeck and Dürsteler-MacFarland, 2006, Kenna et al., 2007, Preti, 2007, Karila et al., 2008a, Karila et al., 2008b, Uys and LaLumiere, 2008). Por tanto, el topiramato podría reducir el craving de cocaína y el uso de la misma en los pacientes dependientes de cocaína.

7.5. Efectos de la topiramato sobre el ojo

Los estudios más recientes sobre este fármaco muestran numerosos efectos adversos, aunque en oftalmología, fundamentalmente, se describe aumento de la presión intraocular (Hadjikoutis et al., 2005) e inducción de miopía (Chen et al., 2003), maculopatía bilateral (Asensio-Sánchez et al., 2006), hemianopsia homónima (Asensio-Sánchez et al., 2006) y glaucoma de ángulo cerrado (Banta et al., 2001, Rhee et al., 2001, Sankar et al., 2001, Nemet et al., 2002, Lin et al., 2003, Chen et al., 2003, Fraunfelder and Freunfelder, 2004).

Recientemente se ha realizado un estudio de la función de la retina en conejos tratados con topiramato durante 8 meses, en los que se ha visto una reducción en la

amplitud de la onda b del ERG, así como cambios inmunohistológicos caracterizados por una acumulación severa de GABA en la retina interna (Kjellström et al., 2006). Sin embargo, otro estudio previo realizado por Yoneda y colaboradores (Yoneda et al., 2003) había mostrado que en un modelo de rata con isquemia en la retina, el tratamiento sistémico con topiramato podría prevenir los daños producidos en dicha estructura de una forma dependiente de la dosis.

Por tanto, el topiramato, como ya hemos visto, podría ser eficaz para el tratamiento de ataques epilépticos y de la adicción a cocaína, pero ante la gravedad de las lesiones oftalmológicas (que pueden ser irreversibles), se aconseja el uso estricto y justificado de este fármaco, así como un control neurooftalmológico en estos pacientes.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestro grupo ha desarrollado diversos estudios sobre los efectos o daños que el alcohol y la cocaína podrían producir sobre el tejido neuronal, especialmente, en el sistema nervioso central. Se han observado numerosas alteraciones, muchas de ellas desencadenadas por la acción de especies reactivas de oxígeno que se forman durante el metabolismo de estas dos sustancias.

La retina es el tejido nervioso del ojo y está formada por diferentes tipos celulares, todos ellos con membranas ricas en ácidos grasos poli-insaturados, lo que las hace muy sensibles a las especies reactivas de oxígeno.

Por tanto, la Hipótesis de esta Tesis es:

Tanto el alcohol, como la cocaína alteran el funcionamiento de la retina, medido mediante ERG y PEV, a través de la formación de especies reactivas de oxígeno y la acción de éstas sobre este tejido neuronal. Además, esperamos que el tratamiento con fármacos como la naltrexona y el topiramato, utilizados en el tratamiento del abuso de alcohol y cocaína respectivamente, eviten el daño producido por estas sustancias sobre la retina.

Para poder verificar o refutar esta hipótesis es necesario que nos fijemos unos objetivos concretos para nuestra investigación:

- 1) Estudiar el efecto de la ingesta crónica de etanol sobre la neurofisiología de la retina, analizando el electroretinograma y los potenciales evocados visuales, y determinar cómo influye el tratamiento con naltrexona sobre dicho efecto.
- 2) Estudiar posibles cambios en los niveles de glutatión reducido, como compuesto antioxidante, la actividad de la glutatión peroxidasa, como enzima antioxidante, y la concentración de malondialdehído, como producto de la peroxidación lipídica, en ojo tras el tratamiento con etanol. Determinar si el tratamiento con naltrexona afecta a estos parámetros por sí solo o en combinación con el alcohol después de un tiempo de consumo.
- 3) Analizar la electrofisiología de la retina después de la administración de cocaína y el tratamiento con topiramato.
- 4) Determinar el efecto del tratamiento con cocaína y/o topiramato sobre diversos factores indicativos de estrés oxidativo, como los niveles de glutatión reducido y de malondialdehído, así como la actividad de la glutatión peroxidasa.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tratamiento de los animales

1.1. Condiciones de estabulación

Para el experimento con alcohol se utilizaron ratas macho de raza Sprague-Dawley que procedían de una camada original de Harlan Iberica S.L. (Barcelona, España), mientras que para el experimento de cocaína se usaron ratas macho de raza Wistar procedentes de una camada original de Charles River S.A. (Barcelona, España). Los animales utilizados se solicitaron de acuerdo al criterio de edad, comprobándose posteriormente la uniformidad de peso y características generales de los mismos.

La estabulación se realizó en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU. En las mencionadas instalaciones, los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 6:00 a 18:00 y de 18:00 a 06:00. Durante su estabulación tuvieron acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan Ibérica S.L. (Barcelona, España).

1.2. Manejo de animales

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Comunidad Europea según la legislación 86/609/EEC y, se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. El número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora y que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis barbitúrica (0.2 ml de Hidrato de Cloral 4%).

2. Diseño de los protocolos experimentales

2.1. Experimento de alcohol

2.1.1. Modelo experimental de alcohol

La Figura 15 detalla el modelo experimental que se desarrollo para realizar este estudio de alcohol.



Figura 15. Modelo experimental de alcohol.

Se realizaron 5 grupos de animales de experimentación:

- Control
- Etanol
- Control + naltrexona
- Etanol + naltrexona

Antes de empezar el experimento, los animales tuvieron un periodo de adaptación de una semana. La duración del tratamiento con alcohol fue de 42 días. El experimento comenzó con dos grupos, control (n=16) y etanol (n=24), a los que se les administró la dieta control y la dieta etanol, respectivamente, durante los primeros 28 días. A partir de ese momento, el grupo control se dividió en dos subgrupos, control y control-naltrexona. Por su parte, el grupo etanol se dividió en otros dos subgrupos, etanol y etanol-naltrexona. Además, a estos dos últimos subgrupos se le sustituyó el último día la dieta etanol por la dieta control. El experimento continuó durante otros 14 días.

2.1.2. Administración de la dieta Lieber-De Carli

El experimento realizado en este trabajo de investigación se basó en el modelo de rata alcohólica crónica, en el que se administró a las ratas como alimento la dieta Lieber-De Carli (TestDiet, London). Brevemente, el modelo del alcoholismo crónico consiste en administrar dieta líquida de alcohol (6% v/v) durante seis semanas. El grupo control recibe, en lugar de alcohol, una mezcla isocalórica con maltosa dextrinada sustituyendo al etanol. Las ratas se agrupan en parejas control-etanol con un peso similar, administrando a la rata “control 1” el volumen de dieta ingerido por la rata “etanol 1” el día anterior.

Las ratas fueron separadas en dos grupos: control y etanol, y se les administró la dieta líquida control y la dieta líquida alcohol, respectivamente.

Para acostumbrar a los animales a la dieta alcohólica, se les administró dieta alcohólica diluida con dieta control durante un periodo de siete días, aumentando los niveles de alcohol poco a poco hasta los valores de la dieta completa. Una vez habituadas, la cantidad de dieta consumida diariamente por cada rata osciló entre 80-100ml.

2.1.3. Medición del alcohol en sangre

Para asegurarnos que las ratas etanol realmente estaban expuestas a los efectos del alcohol durante todo el día, se les determinó la alcoholemia en sangre varias veces, tanto por la mañana como por la tarde. Para ello, se utilizó un kit de alcohol (etanol), referencia 99029, de BIOLABO (Maizy, Francia). Se extraían unos 100µl de sangre de la cola, para conseguir 10µl de suero y con ese volumen se podía expresar la alcoholemia en mmol/L.

2.1.4. Administración de naltrexona

La naltrexona (Sigma, Madrid, España) se administró por inyección intraperitoneal a partir del día 28, a una dosis diaria de 1 mg/Kg, hasta finalizar el experimento. Se utilizó como vehículo suero salino (0.9%). A los animales que no recibieron naltrexona se les administró, ajustando la dosis, únicamente suero salino (0.9%).

2.2. Experimento de cocaína

2.2.1. Modelo experimental de cocaína

Para llevar a cabo este estudio, se desarrolló un modelo experimental en rata que se detalla en la Figura 16.

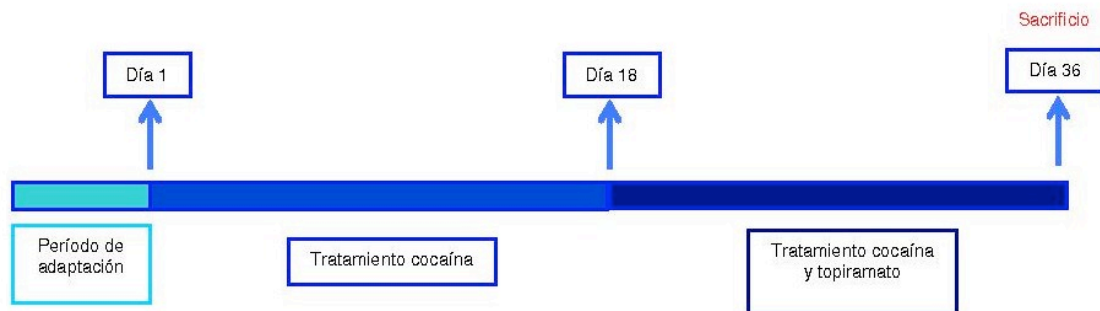


Figura 16. Modelo experimental de cocaína.

Se realizaron 6 grupos de animales de experimentación:

- Control
- Cocaína
- Control + topiramato
- Cocaína + topiramato
- Retirada
- Retirada + topiramato

Antes de empezar el experimento, los animales tuvieron un periodo de adaptación de una semana. El experimento comenzó con dos grupos, control y cocaína, a los que se les administró una inyección diaria de suero salino y cocaína, respectivamente durante 18 días. A partir de ese momento, el grupo control se dividió en dos subgrupos, control y control-topiramato. Por su parte, el grupo cocaína se dividió en cuatro subgrupos, cocaína, cocaína-topiramato, retirada (de cocaína) y retirada-topiramato. El experimento continuó durante otros 18 días, por lo que la duración del tratamiento con cocaína fue de 36 días.

2.2.2. Administración de cocaína

El tratamiento de cocaína se administró por vía intraperitoneal a los individuos del grupo correspondiente, con una dosis diaria de 15 mg/kg. Se utilizó como vehículo suero salino (0.9%), siendo comprobado que este vehículo no tiene efecto sobre los

parámetros a estudiar. Los animales a los que no se les administró cocaína recibieron en su defecto inyección de suero salino (0.9%).

2.2.3. Administración de topiramato

El topiramato se administró vía oral mediante sonda nasogástrica para ratas, a partir del día 19, a una dosis diaria de 10 mg/kg, hasta finalizar el experimento el día 36. Se utilizó como vehículo suero salino (0.9%). A los animales que no recibieron topiramato se les administró, ajustando la dosis, suero salino (0.9%).

3. Análisis electrofisiológicos de la retina y la vía visual

3.1. Electrorretinograma

El electroretinograma se realizó a ratas bajo anestesia con ketamina (100 mg/kg peso) y azepromazina (2,5 mg/kg peso), previamente adaptadas a la oscuridad (un mínimo de 12 h previas a la anestesia). Una vez anestesiados los animales, se colocaron en un inmovilizador y se les administró colirio anestésico y midriático. Los electrodos y la piel se limpiaron con alcohol y se añadió suero fisiológico para disminuir la resistencia. Se utilizaron electrodos de aguja para tierra y referencia, mientras que el electrodo activo (tipo garaba) está hecho mediante hilo de oro con la forma adecuada para situarlo en el fondo de saco conjuntival inferior, y mantener el párpado abierto al mismo tiempo (Figura 17). Se tapó el ojo contralateral. El electrodo de tierra se colocó en la cola de la rata y el electrodo de referencia en la piel del dorso del animal a la altura del cuello. Se esperaron 2 ó 3 minutos para realizar el electroretinograma del ojo contralateral.

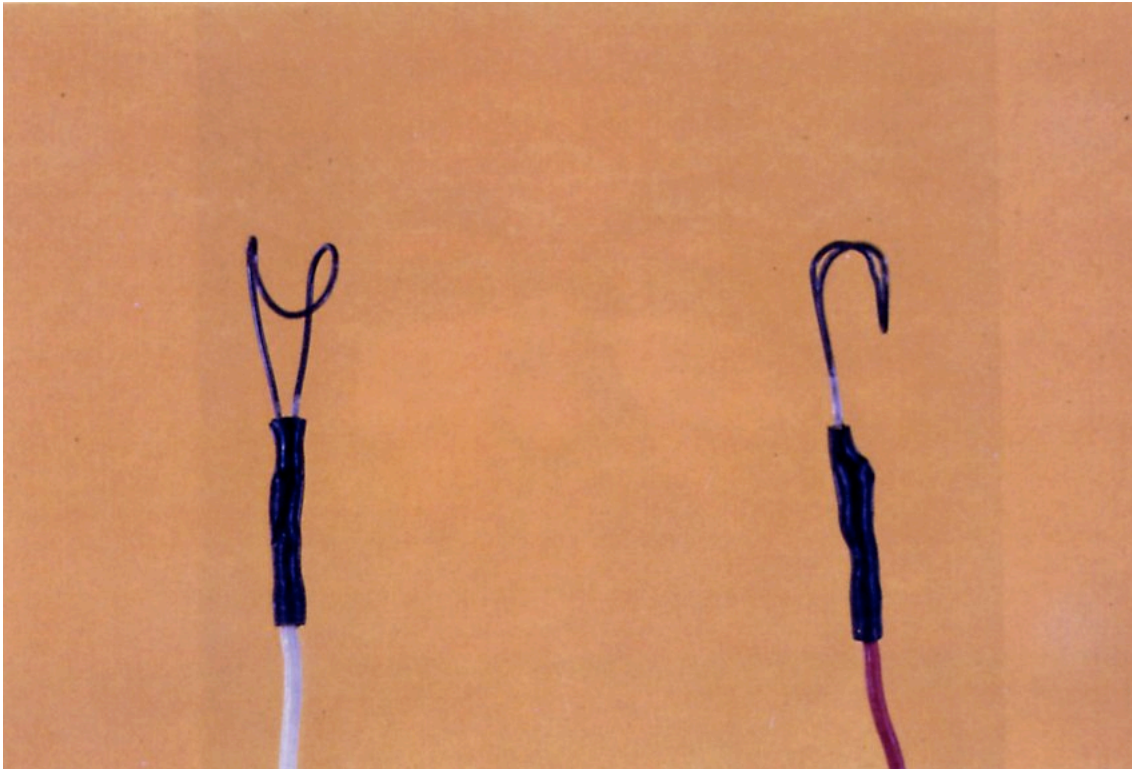


Figura 17. Electrodo corneal tipo garaba.

Los estímulos empleados fueron pulsos monocromáticos de 4ms de duración (average 2; range 100; intensidad 1 (0,06 x 22 lumen sec/ft²)). Se utilizó un filtro azul. El tiempo de registro fue de 100ms. Se promediaron dos estímulos. El ancho de banda del preamplificador se estableció en 3-50 Hz con un rango de 100 μ V y los registros se recogieron automáticamente en un equipo informático MacLab (Castle Hill, Australia), donde se midió la latencia de la onda b del registro (tiempo desde el estímulo hasta el pico de la onda b) y las amplitudes de la onda a (a) y de la onda b (b) (Figura 18) (Celesia et al., 1993).

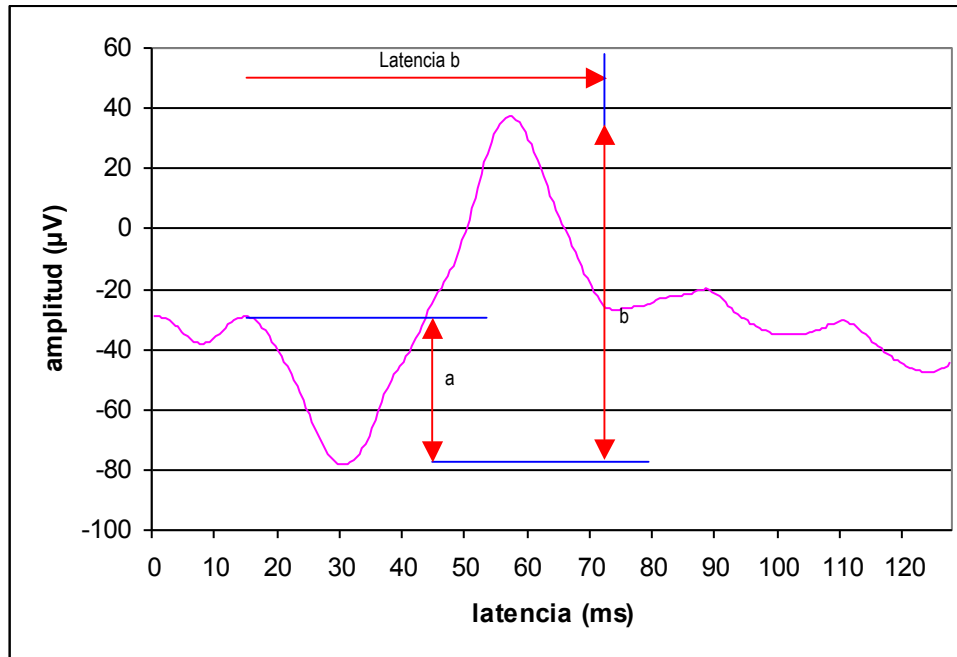


Figura 18. Registro ERG en rata. Parámetros de medida.

3.2. Potenciales evocados visuales

El potencial evocado visual tipo flash (PEV-F) se midió después de 15 minutos de reposo tras el análisis de los ERG. Se utilizaron electrodos de aguja subcutáneos. El electrodo de registro se situó sobre la eminencia occipital media, entre ambas orejas, el electrodo de referencia se colocó en el punto medio de la línea que une ambos ojos, y el electrodo de tierra se implantó en el dorso del tercio medio de la cola. El estímulo luminoso blanco, de las mismas características que el utilizado para el ERG, se emitió a una frecuencia de 1 Hz, y el tiempo de registro tras cada estímulo fue de 200 ms. La señal se filtró utilizando un ancho de banda entre 1 Hz y 5 KHz. Se promediaron 32 registros consecutivos para la obtención del PEV-F.

Los PEV-F se recogieron con el mismo equipo informático que los ERG. Finalmente, se identificó y midió la latencia (ms) y amplitud (μV) de la onda P1, que es la segunda onda que aparece en el registro y es positiva (en humano también se conoce como onda P100, ya que aparece a los 100 ms).

4. Obtención y preparación de las muestras

Al finalizar el estudio electrofisiológico, los animales se sacrificaron con sobredosis de Dolethal. De cada rata se recogieron los ojos y los nervios ópticos, se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

Para el análisis de los parámetros bioquímicos, las muestras se homogenizaron introduciéndolas en un homogenizador de vidrio, que contenía 1ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7.0, a una temperatura de 4°C . Se morturaron las muestras hasta su completa homogenización.

Inmediatamente después, se acidificaron 180 μl del homogenado con 20 μl de ácido perclórico (PCA) al 20%. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C , se recogió el sobrenadante y se conservó a -20°C hasta la determinación de la concentración de glutatión. El resto del homogenado, sin acidificar, se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos a 4°C , se recogió el sobrenadante e igualmente se conservó a -20°C para la determinación de proteínas, actividad glutatión peroxidasa y concentración de malondialdehído.

5. Análisis bioquímicos

5.1. Determinación de proteínas

5.1.1. Fundamento teórico

El contenido de proteínas de las distintas muestras se realizó según el procedimiento descrito por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio (Peterson, 1977) y que a continuación se detallan.

5.1.2. Soluciones

Solución 1: Na_2CO_3 4% y NaOH 0,8% (disolver en 1 litro de agua bidestilada 40 g de carbonato sodio y 8 g de hidróxido sodio).

Solución 2a: CuSO_4 1,25 mM, (disolver en 1 litro de agua bidestilada 200 mg de sulfato de cobre)

Solución 2b: $C_4H_4KNaO_6$ 1,42 mM (disolver en 1 litro de agua bidestilada 400 mg de tartrato sodio potasio).

Para medir las proteínas, mezclar las soluciones 1, 2a y 2b

(Las soluciones 1, 2a y 2b se conservan a 4°C hasta su utilización.)

Solución 3: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (disolver el reactivo de Folin-Ciocalteu comercial en agua en una relación 1:2, respectivamente).

Solución 4: solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml. (La solución 4 se conserva a -20 °C hasta su utilización.)

5.1.3. Procedimiento para la cuantificación de proteínas

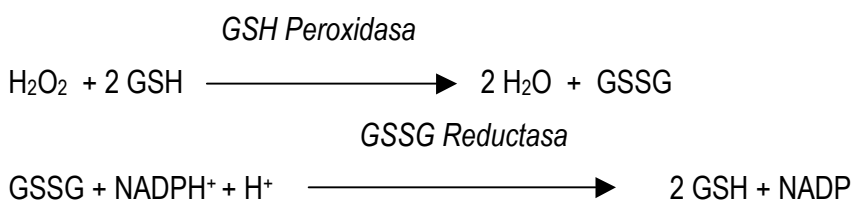
Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución 4 (0, 10, 25, 50, 75, 100 μ l) y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25 μ l). Se añade agua bidestilada hasta 200 μ l. Se mezclan las soluciones 1, 2a y 2b en una proporción 2:1:1, respectivamente, y a cada tubo de ensayo se le añade 1ml de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100 μ l de la solución 3 a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 20 minutos.

Se mide la absorbancia de cada una de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por interpolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queremos conocer.

5.2. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa

5.2.1. Fundamento teórico

La actividad glutatión peroxidasa se determinó según el método propuesto por Lawrence y colaboradores (Lawrence et al., 1978) frente a peróxido de hidrógeno. Está basado en las siguientes reacciones:



La formación del glutatión disulfuro está catalizada por la actividad glutatión peroxidasa de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de

la actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340nm.

5.2.2. Soluciones

Se preparan las siguientes soluciones.

Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM.

Solución B. Glutatión Disulfuro reductasa 2.4 U/mL

Solución C. GSH 10 mM

Solución D. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ al 0.1%

Solución E. Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

5.2.3. Procedimiento analítico para la determinación de la actividad glutatión peroxidasa

Se adicionan de forma sucesiva a una microcubeta las siguientes soluciones:

550 µL de la solución A (tampón fosfato potásico).

50 µL de muestra.

100 µL de la solución B.

100 µL de la solución C.

La muestra se preincuba durante 5 min a 37°C, tras lo cual se añaden 100 µL de la solución D. Se monitoriza durante 1 min el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos.

Por último, se añaden 100 µL de la solución E precalentada y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$c = \frac{V_f}{e \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

Vf = volumen final en ml

Vm = volumen de muestra en ml

e = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de $6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

A = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado.

Los valores se expresan como nanomoles de NADPH consumidos por minuto y por miligramo de proteína.

5.3. Determinación de la concentración de glutatión y glutamato

5.3.1. Fundamento del método

La concentración de glutatión en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed y colaboradores (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos, seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzénico), dando lugar a derivados N-DPN. Estos derivados son rápidamente separados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados, como el glutamato.

5.3.2. Equipo y soluciones

Hemos trabajado con un equipo de HPLC de la marca Gilson que consta de los siguientes componentes:

Bombas cromatográficas: HPLC PUMP 422 MASTER

Detector: de ultravioleta 430

Autoinyector: Kontron Instruments 7125 con bucle de 50 μl

Mezclador dinámico modelo M-491

Controlador Multiport modelo RS-232

Ordenador 486/50 Hz

Software: Data System MT2

La columna cromatográfica de separación empleada es una 3-Spherisorb NH₂ 5 µm, de la casa Waters, de 250 x 4,6 mm. Las condiciones iniciales del flujo son de 1.0ml/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales son mantenidas durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector con capacidad para 112 muestras.

La fase móvil A se prepara con metanol al 80% (800ml de agua calidad HPLC + 3,2 L de metanol) y la fase B se prepara con acetato de sodio 5 M en metanol al 80% (800 ml de acetato de sodio + 3,2 L de metanol). Posteriormente se filtran a través de un filtro-membrana (Scheider y Scuell) de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4°C. Dicha solución madre consiste en una concentración 10 mM de glutatión reducido en agua.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100 mM y m-cresol 0,2 mM.

La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4dinitrobenceno) 1,5% v/v etanol puro. Se prepara fresco cada día y se conserva a 4°C protegido de la luz.

5.3.3. Procedimiento analítico para la determinación de GSH y glutamato

En tubos eppendorf de 1,5 ml pipeteamos 0,1 ml de la muestra y 0,02 ml de solución 1. Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO₃ 2,4 M en KOH 2 M. Incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir solución 2 para formar derivados N-DPN, los cuales requieren 4 horas en oscuridad a temperatura ambiente para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra mínima inyectada es de 50 µl, para tener la seguridad de llenar el bucle de 20 µl.

En cada experimento se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 60; 80; 100 µM). El área del pico obtenido es directamente

proporcional a la concentración de glutatión o, en su caso, glutamato en la muestra, que se calcula por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

5.4. Determinación de la concentración de malondialdehído

5.4.1. Fundamento del método

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de suero, ojo e hipocampo, se ha utilizado una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA.

5.4.2. Equipo y soluciones

Se ha utilizado un equipo de HPLC (Waters) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 binary HPLC Pump.
- Detector de fluorescencia Waters 2475 Multi landa fluorescence .
- Inyector: Waters 717 plus Autosampler con bucle de 50 μ l.
- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador IBM Windows.
- Software: Data System MT2.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Spheryc-5, ODS 5 μ m de 250 x 4,6 mm (Brownlee-Columns). El flujo de la fase móvil es de 1.0 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 seg. La inyección de cada muestra se hace con una jeringuilla de 100 μ l tipo Hamilton (Reno, Nevada).

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μ m de poro y 47 mm de diámetro. Dicha mezcla se gasea correctamente con helio desde media hora antes de realizar el experimento y durante el mismo

La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4°C. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

5.4.3. Procedimiento analítico para la determinación del MDA

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos en baño de agua-hielo (4°C) durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza 10 min antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar centrifugamos durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de CLAR. La cantidad de muestra inyectada fue de 100 µl para tener la seguridad de llenar el bucle de 50 µl.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2 µM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

6. Análisis estadísticos

6.1. Estadístico descriptivos

La medida de tendencia central que se ha utilizado en el presente trabajo ha sido la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos.

$$\mu = \Sigma x / N \quad \text{siendo: } \mu = \text{media}$$

$$x = \text{valor obtenido}$$

$$N = \text{número de casos}$$

La medida de dispersión de los datos utilizada ha sido la desviación estándar de la muestra, definido como:

$$\sigma = \Sigma(x-\mu)^2/N-1$$

siendo: σ = desviación estándar
 x = valor obtenido
 μ = media
 N = número de casos

6.2. Homocedasticidad

El siguiente análisis estadístico que se ha realizado es un test de homocedasticidad (homogeneidad de varianzas), en concreto el test de Levene, con el que se propone como hipótesis nula (H_0) que la desviación estándar de todos los grupos son iguales.

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0: \quad \sigma_i = \dots \sigma_j \\ H_1: \quad \sigma_i \neq \dots \sigma_j \end{array} \right.$$

El nivel de significación (α) que se ha acordado seguir es de 0,05. Por tanto, si el p-valor arrojado por este contraste de hipótesis es menor que α , entonces se podrá rechazar la hipótesis nula, asegurando que la desviación estándar no es igual en todos los grupos.

6.3. Análisis de la varianza (ANOVA)

Para realizar la comparación entre las medias de los diferentes grupos se ha realizado el análisis de la varianza (ANOVA), en el que se considera como H_0 que las medias de todos los grupos son iguales.

$$\begin{cases} H_0: & \mu_i = \dots \mu_j \\ H_1: & \mu_i \neq \dots \mu_j \end{cases}$$

Para este contraste el α también ha sido de 0,05, por lo que si el p-valor del análisis está por debajo de este nivel, se considera que, al menos, una de las medias es diferente a las del resto de los grupos.

En caso de rechazarse la hipótesis nula, hay que realizar un *post hoc*, para determinar exactamente cuáles son los grupos que tienen medias diferentes. El *post hoc* utilizado depende del análisis de homocedasticidad, siendo el DMS, en caso de igualdad de varianzas, o el T3 de Dunnett, en caso de que no exista homogeneidad en las varianzas.

IV. RESULTADOS

1. Pesos

1.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona

En la Tabla 1 se representan los valores inicial y final de peso de los animales promediados de los cuatro grupos del experimento de alcoholismo. No existen diferencias estadísticamente significativas entre estos valores ni al comienzo, ni al finalizar el estudio. Muchas de las neuropatologías asociadas a pacientes alcohólicos se han atribuido a deficiencias vitamínicas. Sin embargo, con la utilización de la dieta Lieber-De Carli se consigue que todos los animales obtengan los mismos nutrientes.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Control	297.5 ± 17.9	403.8 ± 14.3
Control-Naltrexona	291.4 ± 25.8	401.1 ± 25.3
Etanol	297.0 ± 10.3	374.3 ± 18.8
Etanol-Naltrexona	297.9 ± 15.5	376.4 ± 14.4

Tabla 1. Valores del peso inicial y final (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

En la Tabla 2 se recogen las medias de las determinaciones de alcoholemia que se realizaron al azar durante el experimento.

	Alcoholemia (mmol/L)
Control juvenil	0
Etanol juvenil	23,8 ± 3,1
Control adulto	0
Etanol adulto	27,3 ± 3,5

Tabla 2. Alcoholemia en sangre (mmol/L) de las ratas durante el experimento.

Para interpretar estos resultados se utilizó el protocolo del kit utilizado, el cual indica que los niveles de alcoholemia de nuestras ratas etanol se corresponden con una depresión del sistema nervioso central.

1.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato

La evolución del peso de los animales del grupo control desde el comienzo hasta finalizar el experimento fue similar a la del resto de los grupos, como puede observarse en la Tabla 3.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Control	254.0 ± 20.3	343.4 ± 30.8
Control-Topiramato	269.9 ± 25.7	356.1 ± 28.5
Cocaína	278.6 ± 15.3	343.4 ± 18.7
Cocaína-Topiramato	280.6 ± 14.1	337.1 ± 21.6
Retirada	258.4 ± 34.6	351.0 ± 29.7
Retirada-Topiramato	279.7 ± 9.4	344.7 ± 18.3

Tabla 3. Valores del peso inicial y final (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

2. Electrorretinograma

2.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona

2.1.1. Tiempo implícito de la onda a

Tras el tratamiento crónico con etanol se ha observado un aumento estadísticamente significativo en el tiempo implícito de la onda a al comparar el grupo etanol con los grupos control y control-naltrexona (Figura 19; Tabla 4). No obstante, este valor no se ha visto modificado en los animales alcohólicos a los que se les

administró naltrexona durante las dos últimas semanas del estudio (grupo alcohol-naltrexona).

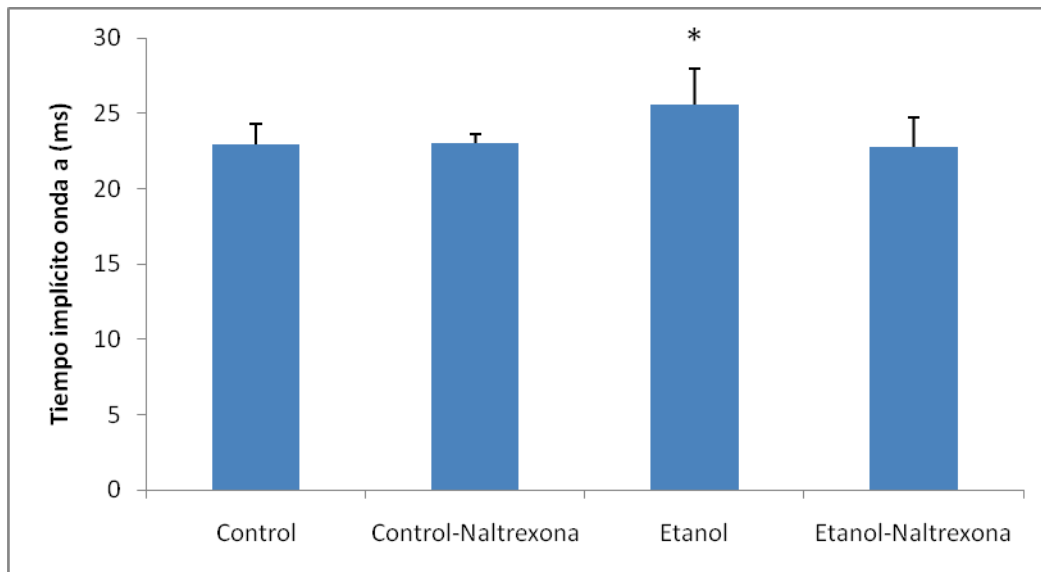


Figura 19. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda a del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms). * $p < 0.05$ vs. todos los grupos.

2.1.2. Amplitud de la onda a

En cuanto a la amplitud de la onda a, no se ha visto ninguna diferencia entre los distintos grupos estudiados (Tabla 5). Estos datos están representados en la Figura 20.

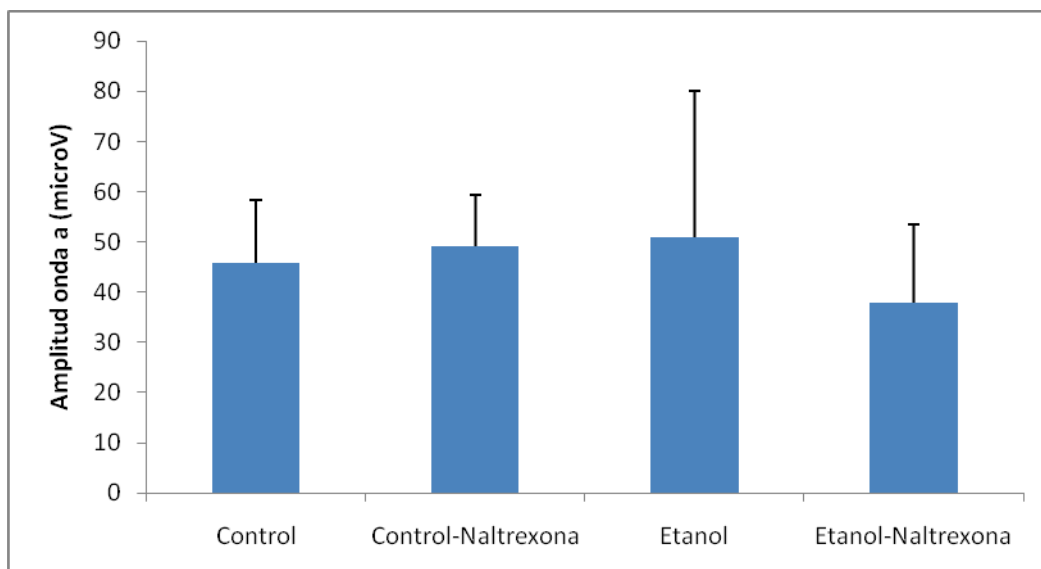


Figura 20. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda a del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (μV).

2.1.3. Tiempo implícito de la onda b

En cuanto al tiempo implícito de la onda b, el tratamiento con alcohol no ha producido ningún cambio después de las seis semanas de estudio, como se puede observar en la Tabla 6, cuyos datos están representados en la Figura 21.

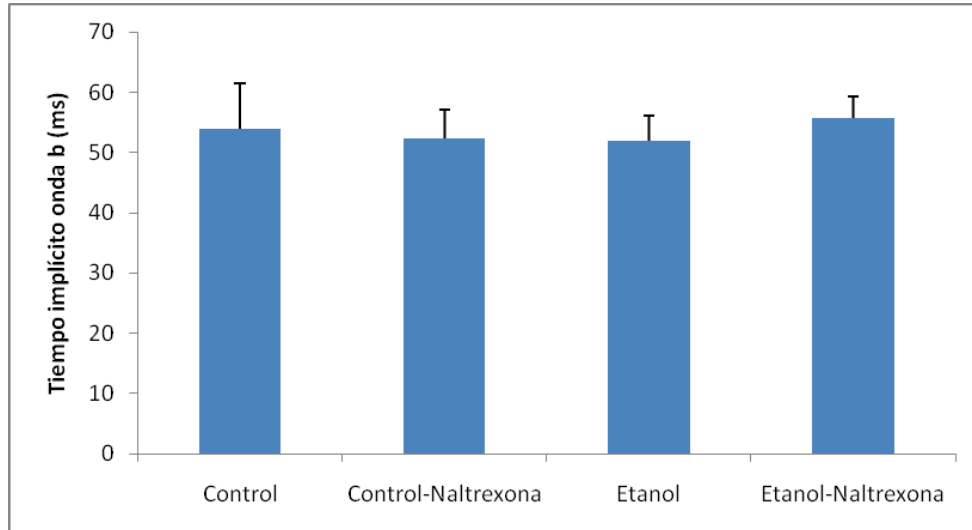


Figura 21. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda b del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms).

2.1.4. Amplitud de la onda b

El tratamiento con alcohol indujo una disminución en la amplitud de la onda b en el grupo etanol, cambio que se mantiene incluso en los animales a los que se les administró naltrexona en el último período del estudio (Figura 22; Tabla 7).

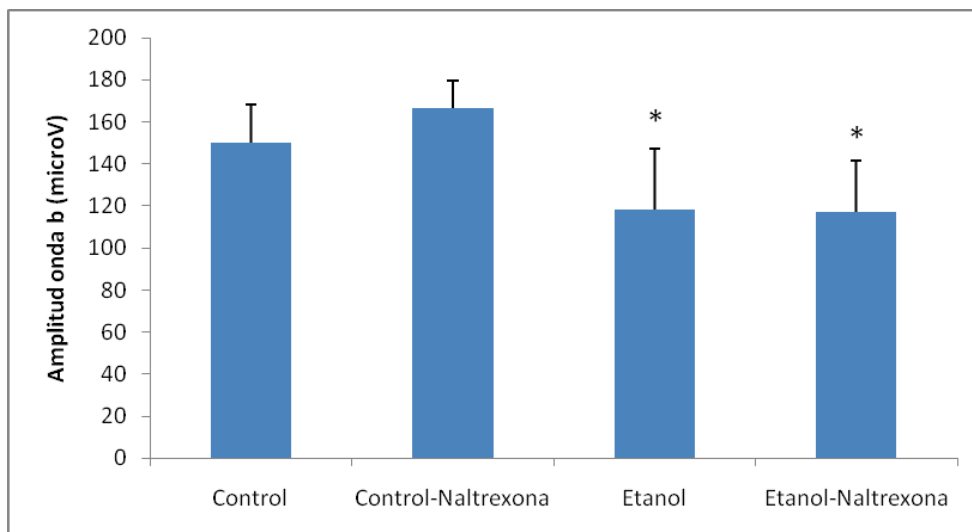


Figura 22. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda b del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (µV). * $p < 0.05$ vs. control y control-naltrexona.

2.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato

2.2.1. Tiempo implícito de la onda a

La Figura 23, abajo representada, muestra el tiempo que tarda en aparecer el máximo de la onda a después de exponer a los animales al estímulo luminoso, sin observarse diferencias entre los diferentes grupos de este estudio (Tabla 8).

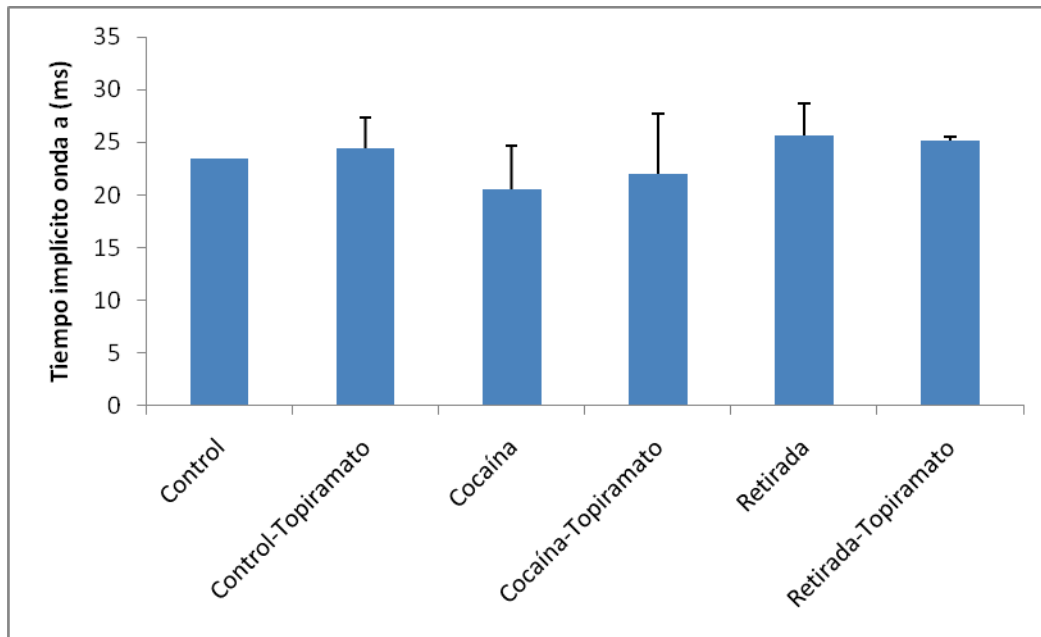


Figura 23. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda a del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).

2.2.2. Amplitud de la onda a

Si se compara el valor de la amplitud de la onda a de los animales tratados únicamente con cocaína con el resto de los grupos (Tabla 9), se observa un descenso estadísticamente significativo. Dichos valores se pueden ver representados en la Figura 24, donde también habría que destacar el grupo cocaína tratado con topiramato y el grupo retirada, ya que ese descenso en la amplitud de la onda a inducido por cocaína se ve recuperado hasta valores similares a los del grupo control.

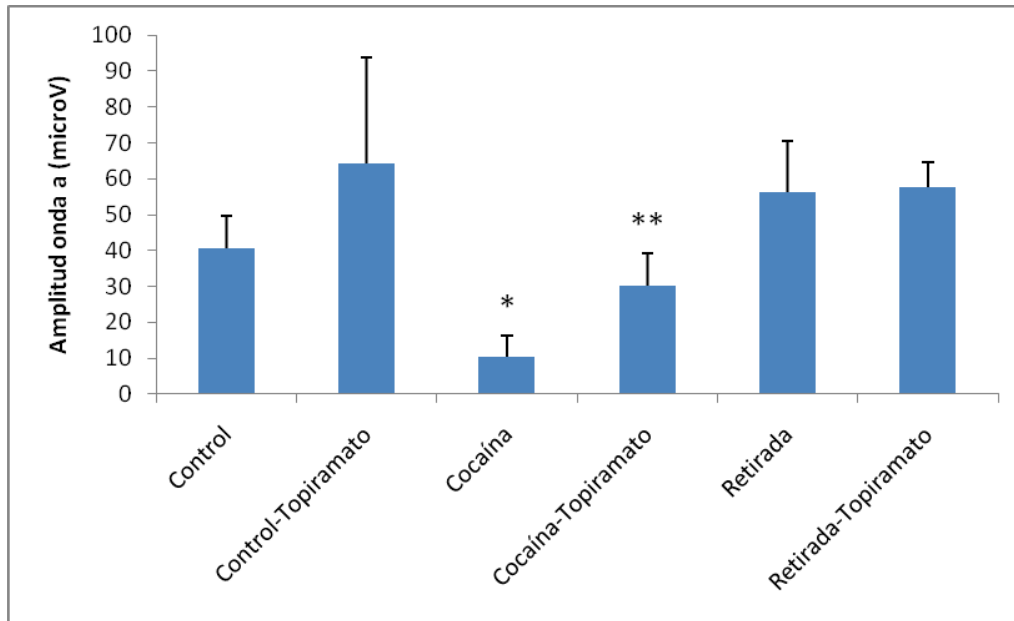


Figura 24. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda a del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV). * $p < 0.05$ vs. todos los grupos; ** $p < 0.05$ vs. retirada-topiramato.

2.2.3. Tiempo implícito de la onda b

Los datos de la medida del tiempo implícito de la onda b se recogen en la Tabla 10 y la Figura 25, que reflejan claramente que no hay diferencias entre ninguno de los seis grupos estudiados.

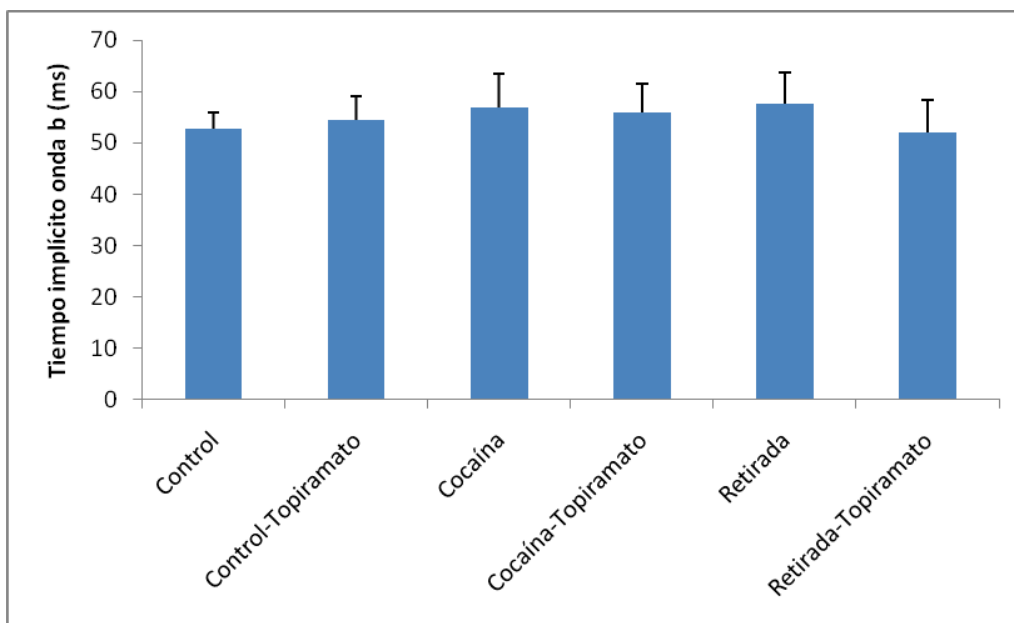


Figura 25. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda b del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).

2.2.4. Amplitud de la onda b

Al comparar los datos obtenidos de la amplitud de la onda b (Tabla 11) no se obtienen diferencias entre los diferentes grupos del estudio. Dichos datos se representan en la Figura 26.

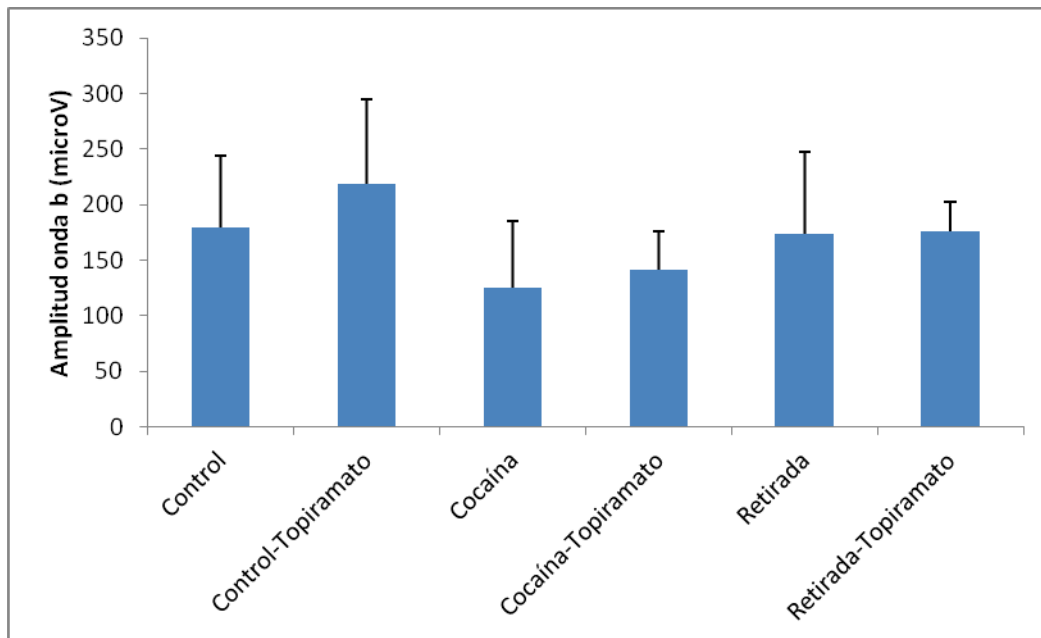


Figura 26. Gráfico comparativo la amplitud de la onda b del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV).

3. Potenciales evocados visuales

3.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona

3.1.1. Tiempo implícito de los potenciales evocados visuales

En la Figura 27 se representan los datos del tiempo implícito de los potenciales evocados visuales obtenidos en el estudio de alcohol. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo etanol, con lo que se puede deducir que el alcohol provoca un cierto retardo en la formación de dichos potenciales en la corteza visual (Tabla 12). Además, cabe destacar que el tratamiento simultáneo de naltrexona con etanol no mejora este efecto del alcohol, ya que también existen diferencias entre el grupo control y el grupo etanol-naltrexona.

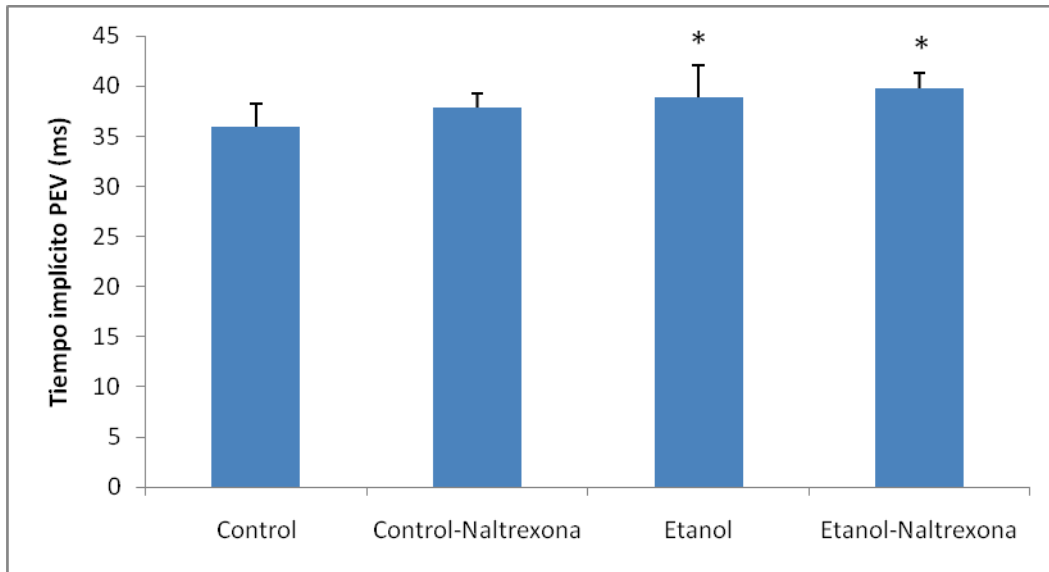


Figura 27. Gráfico comparativo del tiempo implícito de los PEV de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms). * $p < 0.05$ vs. control.

3.1.2. Amplitud de los potenciales evocados visuales

En cuanto a la amplitud de los potenciales evocados visuales, también aquí se han obtenido algunos cambios estadísticamente significativos entre grupos. Como se refleja en la Figura 28, en los grupos control-naltrexona y etanol hay una disminución de este parámetro con respecto al grupo control. Es llamativo no encontrar esa diferencia entre el grupo control y el grupo etanol-naltrexona, aunque hay que señalar que tampoco hay cambios estadísticos entre el grupo etanol-naltrexona y los grupos control-naltrexona y etanol (Tabla 13).

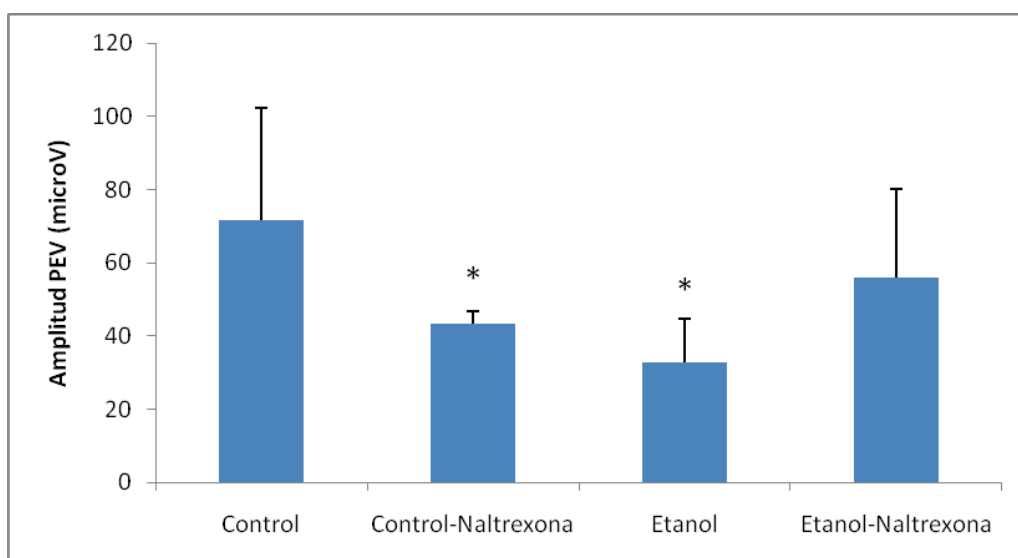


Figura 28. Gráfico comparativo de la amplitud de los PEV de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (μV). * $p < 0.05$ vs. control.

3.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato

3.2.1. Tiempo implícito de los potenciales evocados visuales

La Tabla 14 recoge los datos de las medias del tiempo implícito de los potenciales evocados visuales obtenidos en los distintos grupos del experimento de cocaína. El estudio comparativo de las medias no refleja cambios en este parámetro en ninguno de los grupos tratados. Estos valores se muestran gráficamente en la Figura 29.

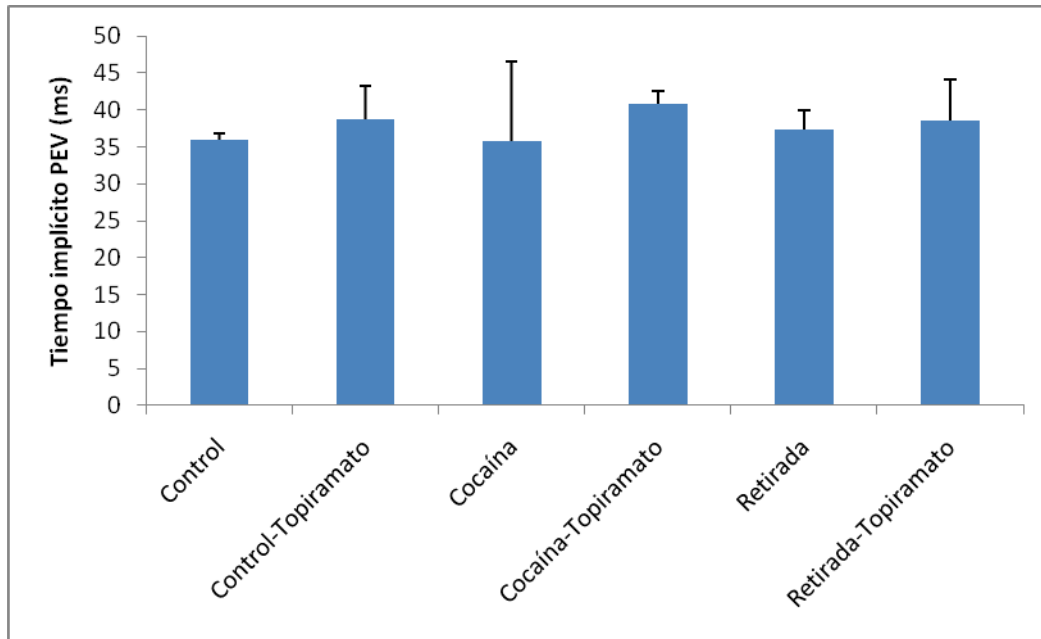


Figura 29. Gráfico comparativo del tiempo implícito de los PEV de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).

3.2.2. Amplitud de los potenciales evocados visuales

No se ha observado ningún cambio estadísticamente significativo en la amplitud de los potenciales evocados visuales entre los diferentes grupos del estudio (Figura 30; Tabla 15).

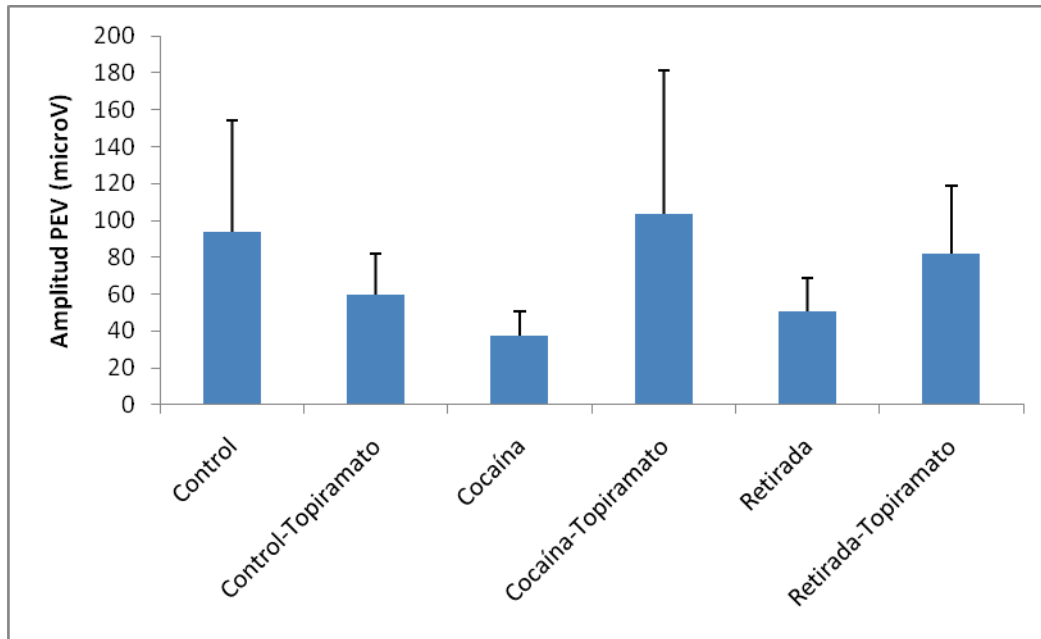


Figura 30. Gráfico comparativo de la amplitud de los PEV de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV).

4. Parámetros bioquímicos indicativos de estrés oxidativo en ojo

4.1. Experimento de alcoholismo y tratamiento con naltrexona

4.1.1. Actividad Glutación Peroxidasa (GSH-Px) en ojo

Como muestra la Tabla 16, el tratamiento crónico con alcohol no ha producido ningún cambio en la actividad de la GSH-Px al comparar dicho dato con el grupo control. Por su parte, tampoco la naltrexona sola ni su administración junto al alcohol produjeron alteraciones sobre la actividad de dicha enzima. Estos valores se ven claramente representados en la Figura 31.

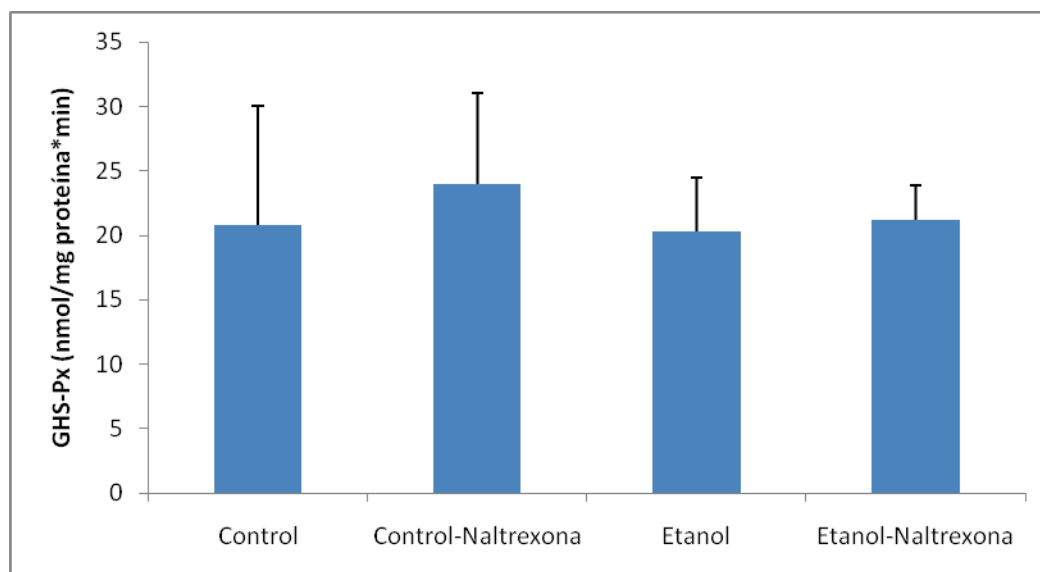


Figura 31. Gráfico comparativo de la actividad glutatión peroxidasa en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y, etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramos de proteína por minuto (nmol/mg proteína*min).

4.1.2. Determinación de glutatión (GSH) en ojo

En la Figura 32 están representados los valores de la concentración de GSH en ojo de los diferentes grupos del estudio de alcoholismo crónico. Estos datos se recogen en la Tabla 17. Como puede observarse, la comparación de las medias de los cuatro grupos no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

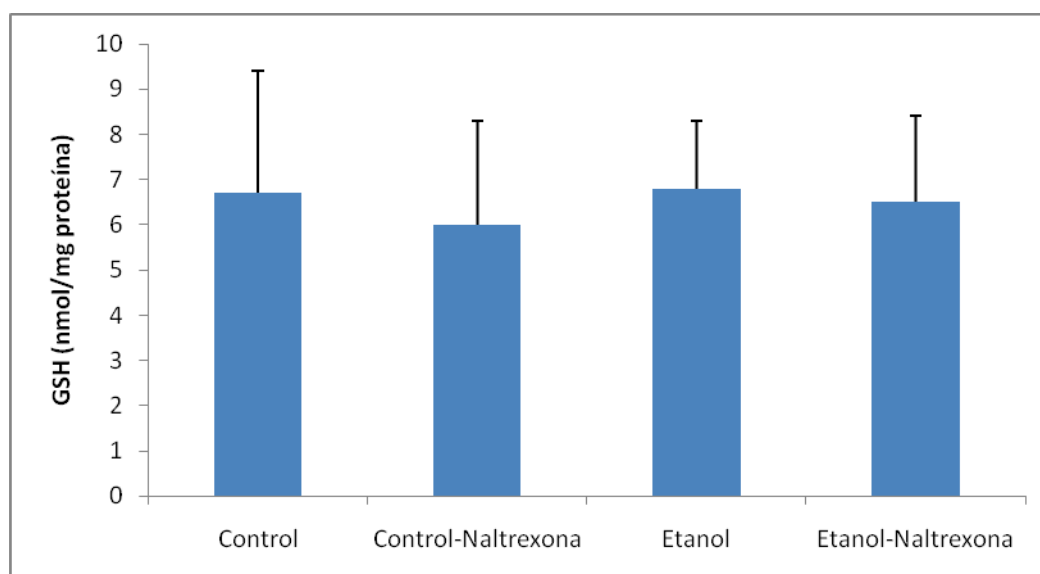


Figura 32. Gráfico comparativo de la concentración de GSH en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.

4.1.3. Determinación de malondialdehído (MDA) en ojo

Otro parámetro bioquímico indicativo de estrés oxidativo que se ha analizado en este trabajo es el valor de MDA (un marcador de peroxidación lipídica) en homogenado de ojo. No se ha obtenido ninguna diferencia entre el grupo control y el grupo etanol (Figura 33; Tabla 18). Estos datos están aparentemente en desacuerdo con resultados previos de nuestro grupo, por lo que se decidió repetir esta medida utilizando exactamente el mismo protocolo que se usó anteriormente (las ratas recibieron dieta etanol hasta el último día del experimento). En este caso, se puede observar que la concentración de MDA está significativamente incrementada en ratas tratadas con etanol hasta el último día del experimento cuando se compara con las ratas control (Figura 34; Tabla 19).

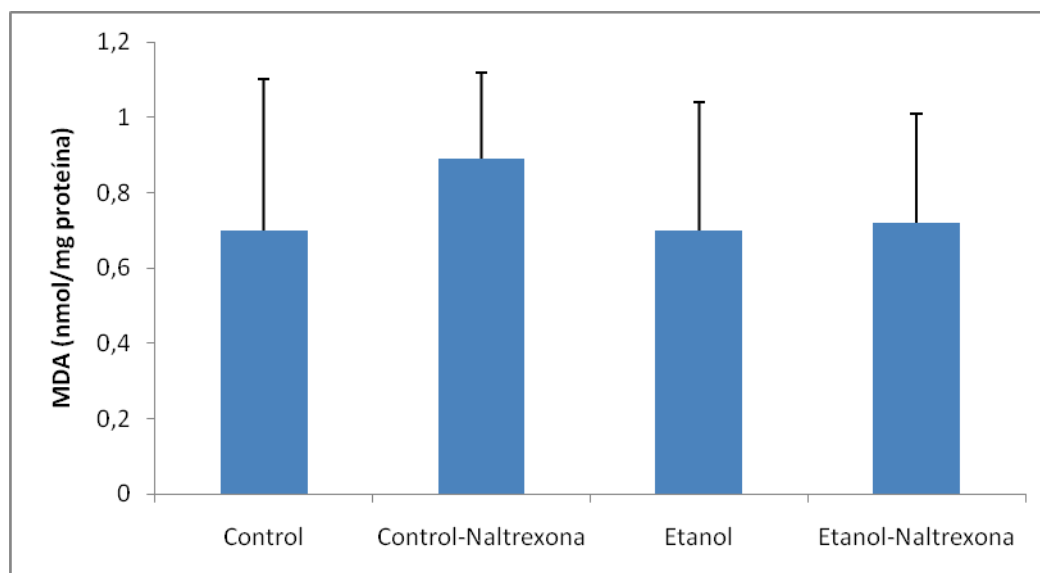


Figura 33. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.

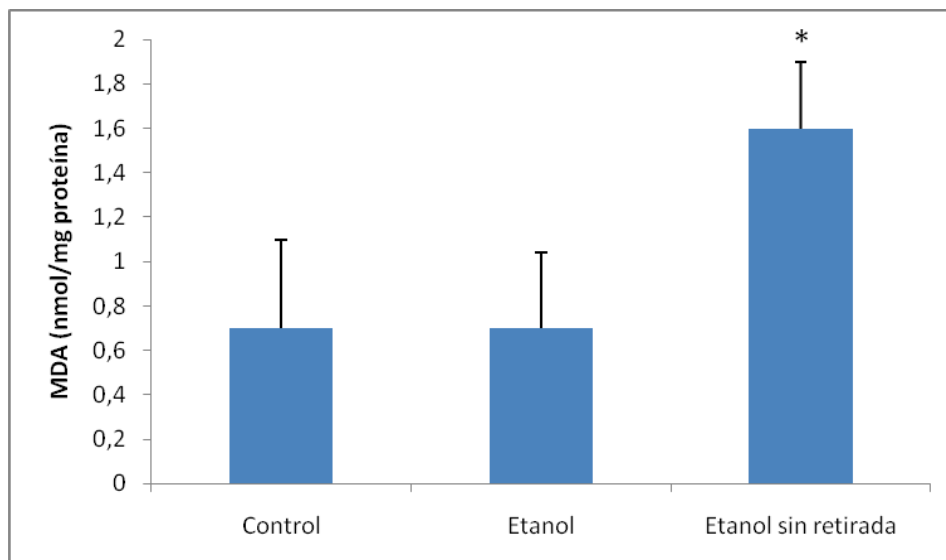


Figura 34. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, etanol y etanol sin retirada, expresado en nanomoles por miligramo de proteína. $p < 0.05$ vs. control y etanol.

4.2. Experimento con cocaína y tratamiento con topiramato

4.2.1. Actividad Glutación Peroxidasa (GSH-Px) en ojo

La Figura 35 nos muestra los datos de actividad glutación peroxidasa de los seis grupos del experimento con cocaína y topiramato. No se ha obtenido ninguna alteración significativa en la actividad de dicha enzima en ninguno de los grupos tratados al compararlos con el valor control (Tabla 20).

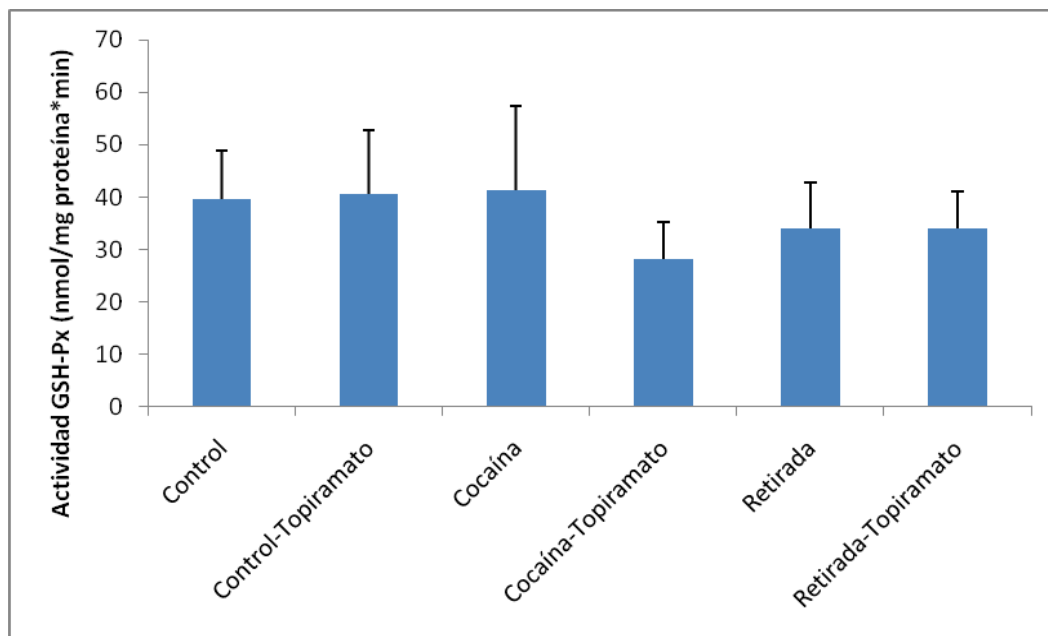


Figura 35. Gráfico comparativo de la actividad glutatión peroxidasa en ojo de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramos de proteína por minuto (nmol/mg proteína*min).

4.2.2. Determinación de glutatión (GSH) en ojo

Otro parámetro bioquímico, cuya alteración podría ser un indicio de estrés oxidativo, que se ha determinado en el experimento de cocaína es la concentración del GSH (Tabla 21). Sin embargo, no se han obtenido diferencias al comparar las medias de estos valores de los distintos grupos de este estudio. Estos datos están reflejados en la Figura 36, abajo representada.

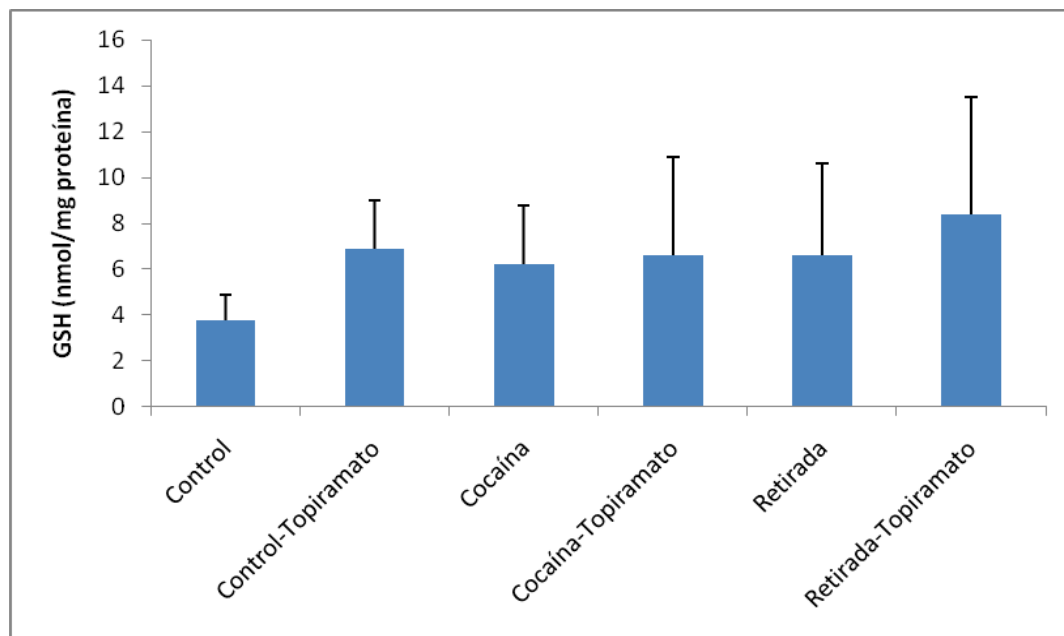


Figura 36. Gráfico comparativo de la concentración de GSH en ojo de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.

4.2.3. Determinación de malondialdehído (MDA) en ojo

La Tabla 22 recoge los valores de la concentración de MDA en ojo del estudio con cocaína y topiramato, datos que están representados en la Figura 37. El análisis comparativo de las medias de este parámetro ha mostrado un dato muy llamativo, y es que los tres grupos tratados con topiramato muestran una disminución en la concentración de MDA al compararlos con el valor del grupo control.

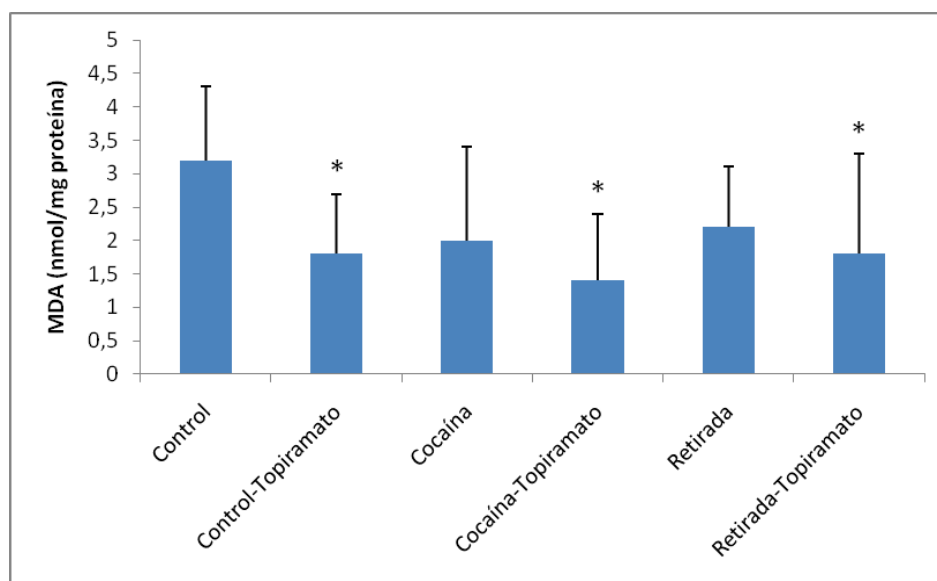


Figura 37. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramo de proteína. * $p < 0.05$ vs. control.

4.2.4. Determinación de glutamato en ojo

La concentración de glutamato está significativamente incrementada en el homogenado de ojo de ratas tratadas con cocaína comparadas con los dos grupos control. Además, el tratamiento con topiramato ha revertido esta alteración en los animales a los que se les ha administrado la droga (Figura 38; Tabla 23).

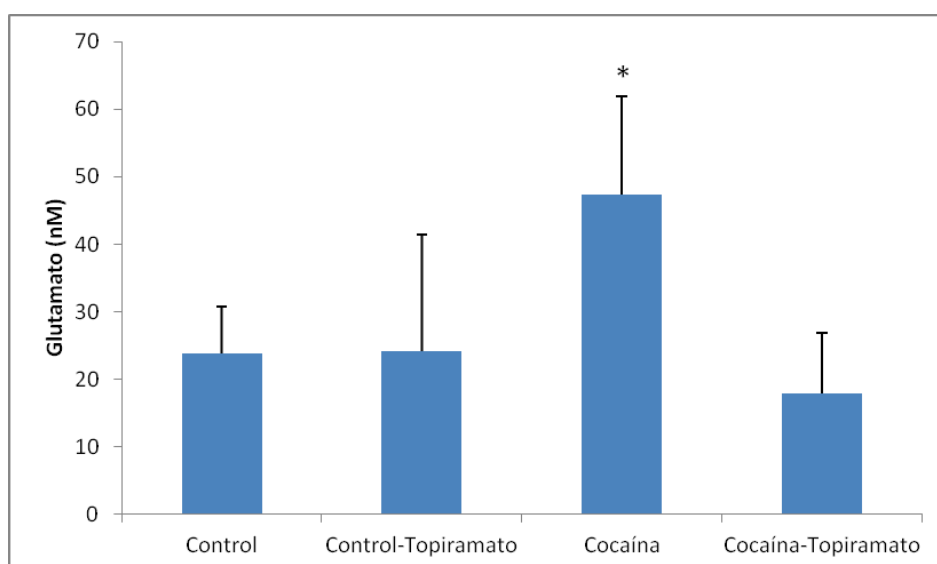


Figura 38. Gráfico comparativo de la concentración de glutamato en ojo de los grupos control, control-topiramato, cocaína y cocaína-topiramato, expresado en nM. * $p < 0.05$ vs. todos los grupos.

4.2.5. Correlación entre los niveles de glutamato y la actividad GSH-Px

La Figura 39 muestra una correlación positiva entre los niveles de glutamato y la actividad de la enzima GSH-Px en homogenado de ojo.

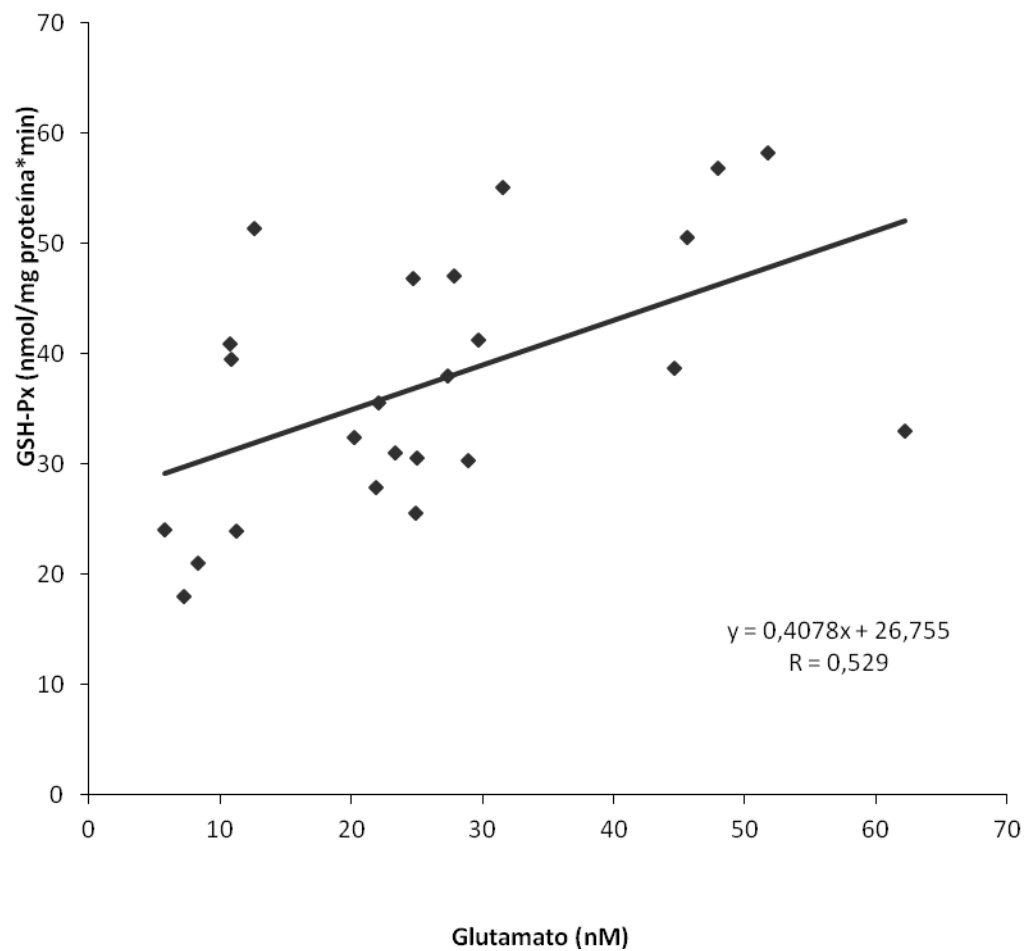


Figura 39. Correlación entre la actividad GSH-Px (nmol/mg proteína*min) y los niveles de glutamato (nM) en ojo del experimento con cocaína y topiramato.

V. DISCUSIÓN

Para comprobar si hay un daño producido en la retina, es importante estudiar la aparición de cambios en el electroretinograma, ya que ésta es la prueba neurofisiológica utilizada habitualmente para objetivar alteración retiniana (Casson et al., 2003, Ranchon et al., 2003, Maier et al., 2004). La electroretinografía permite realizar un registro no invasivo y objetivo del funcionamiento de la retina *in vivo*. Es oportuno recordar que la onda a parece originarse en los fotorreceptores, mientras que son las células de Müller, las bipolares y las amacrinas las que se han relacionado con la formación de la onda b (Introducción 2.3.1.).

Por su parte, el estudio de los potenciales evocados visuales permite detectar objetivamente cuál es el estado funcional de la vía visual, de modo que una alteración de este parámetro indicaría un cambio en algún punto de la vía sináptica desde las células ganglionares de la retina, hasta el cortex visual (Introducción 2.4.3.)

1. Efectos del alcohol sobre la electrofisiología de la retina

La posibilidad de que el alcohol afecte de forma directa la retina es una cuestión aún por resolver. Así como está bien definida la retinopatía diabética, aún no se acepta clínicamente la existencia de una retinopatía o neuropatía óptica alcohólica. Las manifestaciones oftalmológicas de los pacientes alcohólicos han sido atribuidas a otros factores etiológicos como el tabaco (Victor and Dreyfus, 1965, Dunphy, 1969, Hoyt, 1979, Samples and Younge, 1981) o carencias nutricionales (Hamard and Desbordes, 1982, Meinck and Adler, 1982, Behrens, 1983), que con frecuencia se asocian al consumo de etanol.

Hay algunos estudios que muestran alteración del ERG en el abuso de etanol. En un experimento de larga duración realizado en primates sometidos a ingesta crónica de etanol, Pawlosky y colaboradores demostraron una alteración del ERG, aumentando las latencias de las ondas a y b, y disminuyendo la amplitud de la onda b (Pawlosky et al., 2001). Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron también un descenso en la amplitud de la onda b del ERG en ratas tratadas con etanol durante seis semanas, sin que hubiera ninguna diferencia nutricional entre los animales control y los tratados (Johnsen-Soriano et al., 2007b, Sancho-Tello et al., 2008).

En este trabajo se han visto dos parámetros electroretinográficos afectados después de seis semanas de tratamiento con alcohol. En primer lugar, se observa un aumento en el tiempo implícito de la onda a (Figura 19; Tabla 4), lo que indicaría una ralentización en la hiperpolarización de los fotorreceptores. Además, es interesante destacar que en animales tratados con etanol y naltrexona no se ha producido este cambio en el ERG. No obstante, con este diseño experimental no se podría saber si esto se debe a que la naltrexona ha tenido un efecto terapéutico o un efecto profiláctico.

El segundo efecto del tratamiento con alcohol sobre la electrofisiología de la retina ha sido una disminución en la amplitud de la onda b (Figura 22; Tabla 7), posiblemente causada por una disfunción de las células de Müller, las bipolares o las amacrinas. En este caso, la administración de naltrexona durante las dos últimas semanas de tratamiento con alcohol no ha producido ninguna mejora en este parámetro.

Estos datos se corresponden con algunos resultados de trabajos previos. Sin embargo, Pawlosky, como hemos visto, también encontró un aumento de la latencia de la onda b del ERG, manifestado a lo largo de los cinco años que duró el experimento. No se puede descartar que prolongando nuestro periodo experimental se acabara obteniendo también esta alteración en la onda b.

Como ya hemos señalado, en trabajos realizados anteriormente por nuestro grupo el tratamiento con alcohol no indujo ningún cambio en la latencia de la onda a, que es el tiempo que transcurre desde que se genera el estímulo luminoso hasta que aparece la onda a. Sin embargo, en este estudio hemos querido analizar el tiempo implícito, que es el que transcurre desde la aparición del estímulo hasta que la onda a alcanza su amplitud máxima, observándose un aumento en dicho parámetro.

1.1. Aumento del tiempo implícito de la onda a tras el tratamiento crónico con alcohol

Los fotopigmentos visuales se denominan opsinas y son proteínas transmembrana asociadas a proteína G. En el ser humano, la opsina de los bastones se denomina rodopsina, mientras que los conos poseen tres tipos diferentes de opsinas. Un experimento realizado por Anderson y colaboradores en 1985 (Anderson et al., 1985) mostró que la peroxidación lipídica inducida por alcohol *in vitro* podría disminuir la función de los fotorreceptores a través de un descenso en la regeneración de la

rodopsina. Otro estudio desarrollado por Goss-Sampson y colaboradores en 1998 (Goss-Sampson et al., 1998) sugirió que alteraciones en la fluidez de las membranas de los fotorreceptores y el aumento de la peroxidación lipídica provocadas por un déficit de vitamina E, podrían afectar a la rodopsina, lo que explicaría las anomalías observadas en procesos de hiperpolarización y despolarización de los fotorreceptores. Es importante puntualizar que estos estudios que acabamos de citar hablan únicamente de la rodopsina, y señalar que en condiciones de adaptación completa a la oscuridad, como es el caso de nuestro estudio, la curva de la sensibilidad espectral del ERG se aproximaba al espectro de absorción de la rodopsina

Datos publicados por nuestro grupo muestran un aumento en la peroxidación lipídica en ojos de ratas tratadas con alcohol durante seis semanas, medido como un aumento en la concentración de MDA (Johnsen-Soriano et al., 2007b, Sancho-Tello et al., 2008). Por tanto, el aumento del tiempo implícito de la onda a del ERG obtenido en este trabajo tras un tratamiento crónico con alcohol podría estar relacionado con una alteración en las membranas lipídicas de los fotorreceptores, lo que ralentizaría la hiperpolarización de dichas células.

1.2. Disminución de la amplitud de la onda b por el alcohol

Ya que la onda b del ERG es producida principalmente por las células de la retina interna (células de Müller, principalmente, pero también células ganglionares y amacrinas) (Miller and Dowling, 1970, Dick et al., 1985, Gottlob et al., 1988, Chappell et al., 2002), la disminución de la amplitud de la onda b que se observa en el grupo etanol puede atribuirse a una disfunción de las mismas.

Existen otros modelos experimentales donde se observa esta misma relación entre la alteración de la célula de Müller y la disminución de la amplitud de la onda b del ERG. Kainz y colaboradores, en un modelo de déficit visual inducido por mutación en embrión de pez cebra, observaron una gran correlación entre la afectación de la célula de Müller durante el desarrollo embrionario y la disminución de la onda b, así como la posible afectación del desarrollo de los fotorreceptores cuando se daña precozmente la célula de Müller (Kainz et al., 2003). Roth y colaboradores, en un modelo de isquemia retiniana por aumento de la presión intraocular en rata, observaron un aumento de la expresión de ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) en las células de Müller, asociado a una disminución de la onda b. Además, el bloqueo de la

expresión de ERK recuperó la amplitud de dicha onda (Roth et al., 2003). En un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en rata se observó una marcada disminución de la onda b y –en menor medida- de la onda a, previa a la sobreexpresión de GFAP en las células de Müller (Li et al., 2002). Esta afectación de las células de Müller también ha sido comprobada en un estudio necrópsico sobre retinas de pacientes diabéticos (Mizutani et al., 1998). También en la insuficiencia hepática se ha buscado una posible afectación de la retina, demostrándose neurofisiológicamente una disminución de la onda b del ERG, en los casos avanzados, por posible disfunción de las células de Müller, de forma similar a la lesión de otras células gliales, causante de la llamada encefalopatía hepática (Eckstein et al., 1997).

Sin embargo, también son varios los estudios que vinculan la disminución de la onda b a otros tipos celulares: así, Peachey y colaboradores, en un modelo de sobreexpresión de Bcl-2 en ratón transgénico observaron una disminución de la onda b asociada a la pérdida de células bipolares (Peachey et al., 2003). En el estudio ya citado de Roth, también se observó un aumento de la expresión de JNK (quinasa c-jun N-terminal) y p38 en las células amacrinas, ganglionares, en la capa de axones y en los axones de las células bipolares, y el bloqueo de la expresión de p38 también contribuyó a la recuperación de la onda b (Roth et al., 2003). Dong, por su parte, demostró como el bloqueo del feedback de GABA_c de las células amacrinas sobre las células bipolares disminuye la amplitud de la onda b, involucrando por tanto a estas células en la génesis de dicha onda (Dong and Hare, 2002).

En resumen, si las alteraciones en todos estos tipos celulares anteriormente mencionadas provocan cambios en la amplitud de la onda b, sería lógico pensar que la disminución de dicho parámetro observado en este trabajo se deba a un efecto, directo o indirecto, del alcohol sobre estas células. En concreto, un estudio realizado anteriormente por nuestro grupo sugirió un importante papel de las células gliales en los cambios inducidos por el etanol en la onda b. Este estudio demostró un incremento en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en la retina de ratas tratadas con alcohol en estas áreas, lo que fue negativamente correlacionado con la amplitud de la onda b del ERG de estas ratas (Sancho-Tello et al., 2008). Sin embargo, para confirmar este hecho serían necesarios muchos más estudios que nos permitan elucidar los mecanismos que implican a estos cambios.

2. Efectos del alcohol en la vía sináptica hasta el cortex visual

Además de realizar un estudio electrofisiológico de la retina, en este modelo de alcoholismo crónico se ha desarrollado otro análisis neurofisiológico complementario para conocer más a fondo el estado funcional de la vía visual de los animales tratados. Para ello se han medido los potenciales evocados visuales tal y como se describe en el punto 3.2 del apartado Material y Métodos. El resultado de este análisis ha sido una alteración de los dos parámetros estudiados: aumento del tiempo de latencia de los PEV inducido por el alcohol y que no se revierte con el tratamiento con naltrexona; y disminución de la amplitud de los PEV provocado tanto por el alcohol como por la naltrexona.

Al realizar una revisión de todos los trabajos realizados durante las últimas décadas sobre el alcohol y sus efectos en el nervio óptico, queda claro que dicha sustancia produce importantes daños sobre este nervio. Durante la década de los 90, y también algo después, gran cantidad de estos estudios se centraron en el síndrome alcohólico fetal (FAS), llegando todos ellos a la misma conclusión: estos animales presentan una hipoplasia del nervio óptico consistente en una reducción en el número de axones de dicho nervio y una disminución en su tasa de mielinización (Strömmland, 1985, Ferriero et al., 1992, Ashwell and Zhang, 1994, Parson et al., 1995, Parson and Sojitra, 1995, Dangata and Kaufman, 1997, Pinazo-Duran et al., 1997, Matsui et al., 2006, Pons et al., 2007). Incluso existen casos documentados de niños con FAS en los que también se ha observado hipoplasia del nervio óptico después de un examen oftalmológico (Hug et al., 2000).

En 1984, Kelley y colaboradores realizaron un estudio con pacientes alcohólicos en los que observaron un aumento en la latencia de los PEV (Kelley et al., 1984). Además, es interesante señalar que dicho parámetro se recuperó, aunque sólo en pacientes jóvenes, después de 3 semanas de desintoxicación. Resultados similares obtuvieron Nazliel y colaboradores, en 2007 (Nazliel et al., 2007), en algunos de sus pacientes alcohólicos al realizarles un estudio de los PEV estructurados. Resende y colaboradores, en 2001 (Resende et al., 2001), observaron una prolongación de las latencias de los PEV de flash, aunque no de los PEV estructurados, en voluntarios normales después de una ingesta aguda de alcohol. Varios años antes, Boyes y

colaboradores también encontraron cambios en los PEV en un modelo experimental de alcoholismo agudo con ratas (Boyes et al., 1993).

No obstante, no se puede olvidar que una alteración en los PEV podría deberse a cambios en el ERG, de modo que para poder utilizar los primeros para evaluar la vía visual hasta el cortex, no deberían observarse alteraciones en los segundos.

2.1. Aumento del tiempo de latencia de los PEV inducido por el alcohol

Kjellström y colaboradores, en 1993, observaron, tras un tratamiento crónico con alcohol, una disminución en el calibre del nervio óptico de los animales relacionado con pérdida de mielina, pero sin disminución en el número de axones (Kjellström and Conradi, 1993). Otros casos de consumo crónico de alcohol en humanos también han mostrado una atrofia del nervio óptico (Antonowicz and Lenkiewicz, 1994, de Lima Rde et al., 2006).

En el estudio que aquí se presenta, se ha observado un aumento en el tiempo implícito de los PEV inducido por el alcohol, efecto que, además, no ha sido revertido por el tratamiento con naltrexona. Esto podría deberse a una pérdida de mielina en el nervio óptico de los animales tratados con alcohol, ya que esta sustancia acelera la transmisión de impulsos nerviosos.

2.2. Disminución de la amplitud de los PEV inducido por el alcohol

En 2002, un trabajo realizado por nuestro grupo con un modelo experimental de alcoholismo crónico mostró un incremento de los productos de peroxidación lipídica junto con un descenso de antioxidantes celulares (GSH), lo que implicó al estrés oxidativo en la toxicidad del etanol en el nervio óptico de rata (Aviñó et al., 2002). Por lo tanto, la disminución en la amplitud de los PEV, tanto en el grupo alcohol como en el grupo alcohol-naltrexona, obtenida en este trabajo podría estar relacionada con un daño oxidativo provocado por el alcohol sobre el nervio óptico de estos animales.

Por otro lado, este cambio en los PEV también se ha observado en los animales tratados con naltrexona durante las dos últimas semanas del experimento. Varios estudios han mostrado que la naltrexona podría actuar como una neurotoxina,

provocando cambios degenerativos en las terminales nerviosas de ciertas regiones del cerebro (Saland et al., 1984, Saland et al., 1986, Saland et al., 1990). Graham y colaboradores sugirieron que la salida de glutamato podría estar regulada por receptores opioides durante la isquemia y que la inhibición de la salida de este aminoácido excitatorio podría contribuir a las acciones protectoras de los antagonistas de receptores opioides en la isquemia cerebral (Graham et al., 1993). Sin embargo, este efecto de la naltrexona en la salida de glutamato podría estar afectando a la transmisión de la señal luminosa por el nervio óptico hacia la corteza visual.

Luego, los datos observados en este trabajo apoyarían la hipótesis de que el alcohol podría producir una disminución de la mielinización y daño oxidativo en las membranas de las neuronas que componen el nervio óptico, lo que dificultaría la transmisión del impulso nervioso desde la retina hacia la corteza visual.

3. Efecto del alcohol sobre parámetro bioquímicos indicativos de estrés oxidativo

A lo largo de los años se ha observado que muchos pacientes con problemas de consumo de alcohol muestran problemas de pérdida de visión, aunque en la mayoría de los casos esto se ha atribuido a un efecto sinérgico del alcohol y el tabaco (Samples and Younge, 1981), e incluso a un déficit de ciertas vitaminas debido a una mala nutrición (Hoyt, 1979). Sin embargo, muchos trabajos han apoyado que estas alteraciones se deben también a un efecto directo del alcohol en la generación de radicales libres o de sus metabolitos, los cuales podrían dañar tejidos como la retina o el nervio óptico (Introducción 3.5.3.).

En este trabajo se han estudiado varios parámetros bioquímicos en tejido de ojo, que podrían indicar estrés oxidativo producido por el tratamiento crónico con el alcohol (Resultados 4.1.). Sin embargo, no se han obtenido diferencias para ninguno de estos parámetros al comparar los cuatro grupos del estudio (Figura 31, Figura 32, Figura 33; Tabla 16, Tabla 17, Tabla 18). Estos datos difieren de otros obtenidos anteriormente por nuestro grupo (Johnsen-Soriano et al., 2007b, Sancho-Tello et al., 2008). No obstante, existe una diferencia importante entre este modelo experimental y otros realizados anteriormente, y es que en el presente trabajo el alcohol fue retirado un día antes del sacrificio tanto en el grupo alcohol como en el grupo alcohol-naltrexona. Por ello, se

decidió repetir el experimento para la determinación del MDA con sólo tres grupos: control, etanol sin retirada y etanol con retirada del mismo el último día. Como se esperaba, los grupos control y etanol con retirada no han mostrado diferencias entre sí, mientras que el grupo sin retirada ha presentado un aumento en los niveles de MDA al compararlos con los del grupo control y etanol (Figura 34; Tabla 19). El MDA es un producto derivado de la peroxidación lipídica, y es una molécula volátil, que se une a proteínas (Miranda et al., 2007). Por tanto, el hecho de que los niveles de MDA se recuperen hasta valores normales tras un solo día de retirada de alcohol, no implica que el daño producido en las membranas celulares por peroxidación lipídica también se revierta. El aumento en el tiempo implícito de la onda a en el grupo etanol, aún con retirada de alcohol, podría apoyar esta idea.

4. Efectos de la cocaína sobre la electrofisiología de la retina

Como ya se ha señalado en la Introducción 4.5, el abuso de cocaína podría provocar severas complicaciones vasculares en la retina de estos pacientes. Además, recientemente Ascaso y colaboradores (Ascaso et al., 2009) observaron el primer caso de maculopatía bilateral y simétrica asociada al uso intranasal de cocaína durante largo tiempo.

En un estudio electrofisiológico de la retina, la onda a negativa del ERG representa la hiperpolarización de los fotorreceptores en respuesta a un estímulo luminoso (Robson and Frishman, 1998-1999). Se ha mostrado que pacientes dependientes de cocaína tienen afectada la función de los conos azules (Roy et al., 1996, Roy et al., 1997). Estas alteraciones en la función de los conos están en concordancia con los resultados de este trabajo, ya que se ha mostrado un descenso en la amplitud de la onda a del ERG en el grupo tratado con cocaína comparado con el grupo control (Figura 24; Tabla 9). Este efecto de la cocaína sobre la electrofisiología de la retina no se ha observado en el grupo retirada. Habría que realizar más estudios para saber si esto se debe a que 18 días con tratamiento de cocaína no son suficientes para provocar daños en la retina, o a que durante los días de retirada de esta droga el tejido ha sido capaz de revertir los posibles daños.

El topiramato es un fármaco que se ha propuesto como un tratamiento eficaz en pacientes con dependencia a cocaína (Zullino et al., 2002, Zullino et al., 2004). Además, Yoneda y colaboradores (Yoneda et al., 2003) propusieron al topiramato como un tratamiento eficaz para enfermedades relacionadas con la retina, en concreto, para prevenir un daño isquémico en la retina, aunque con dependencia de la dosis de este fármaco. En el estudio que aquí se presenta, el grupo cocaína-topiramato muestra una amplitud de la onda a del ERG comparable con la del grupo control, y estadísticamente diferente a la del grupo cocaína. Esta onda a (hiperpolarización de los fotorreceptores) aparece como consecuencia del cierre de canales de Na^+ y de Ca^{2+} después de recibir un estímulo de luz, lo que se traduce en una disminución de la salida de glutamato. Diferentes estudios han mostrado que el topiramato podría actuar inhibiendo la actividad neuronal de canales de Na^+ y de Ca^{2+} y la salida de glutamato mediada por estos canales (White, 2005, Sitges et al., 2007). Este mecanismo de acción del topiramato podría explicar el hecho de que en el grupo cocaína-topiramato no se dé el descenso en la amplitud de la onda a observado en el grupo cocaína.

5. Efectos de la cocaína y el topiramato sobre parámetros bioquímicos indicativos de estrés oxidativo

El abuso de cocaína puede originar gran cantidad de desórdenes (Introducción 4.4.), incluyendo alteraciones de la función visual. Se han propuesto muchos mecanismos sobre la toxicidad de la cocaína, incluyendo la posibilidad de que esta droga induzca un incremento en el estrés oxidativo debido a una oxidación excesiva de la dopamina o por el ciclo redox de metabolitos de la cocaína (Numa et al., 2008). Se ha visto una asociación entre la administración de cocaína y la inducción de estrés oxidativo en diferentes regiones del cerebro, lo que podría sugerir que el daño oxidativo sea un factor muy importante en los efectos que la cocaína produce sobre las funciones normales del sistema nervioso central, ya que éste es un tejido con mayor vulnerabilidad al daño oxidativo (Numa et al., 2011).

En este trabajo no se han encontrado cambios en los parámetros bioquímicos relacionados con estrés oxidativo estudiados en la retina de las ratas del grupo cocaína, comparados con los del grupo control (Figura 35, Figura 36 y Figura 37; Tabla 20, Tabla 21 y Tabla 22). Es posible que la cocaína no induzca estrés oxidativo en la retina de

ratas, y, en este sentido, también es posible que diferentes áreas del sistema nervioso central responda de forma diferente ante una misma agresión. En concreto, nuestro grupo ha mostrado que el cortex frontal y el hipocampo responden de manera diferente frente a la cocaína, ya que el primero no muestra diferencia en los marcadores de estrés oxidativo entre los grupos control y cocaína, mientras que el hipocampo de animales tratados con cocaína presenta un descenso en la concentración de GSH y en la actividad GSH-Px (Muriach et al., 2010). Incluso, sería posible que el daño por estrés oxidativo inducido por cocaína en la retina esté restringido a ciertos tipos celulares (por ejemplo, fotorreceptores), y que este efecto específico no sea detectable o esté diluido cuando se analiza toda la retina.

6. Efectos de la cocaína sobre los niveles de glutamato

En el presente trabajo se han observado alteraciones electroretinográficas inducidas por la administración de cocaína durante 36 días. Sin embargo, tal y como desvelan los resultados de los análisis bioquímicos, no parece que estas alteraciones estén relacionadas (o al menos no directamente) con estrés oxidativo. Por este motivo, y teniendo en cuenta que el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio de la retina, se decidió analizar las concentraciones de este aminoácido. Los resultados de este análisis mostraron un incremento en la concentración de glutamato en el ojo de ratas tratadas con cocaína (Figura 38; Tabla 23). Éste es el primer estudio que muestra un incremento de este aminoácido en los ojos de ratas expuestas a esta droga.

Este aumento en los niveles de glutamato inducido por tratamiento con cocaína se ha observado con anterioridad en diferentes áreas del cerebro (Jimenez-Rivera and Waterhouse, 1991, Rockhold et al., 1991, Karler et al., 1994). Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene este aminoácido en la retina, un exceso en los niveles de glutamato puede provocar daños neuronales severos, incluyendo isquemia en la retina, glaucoma y otras enfermedades de la retina (Ambati et al., 1997, Osborne et al., 2004, Moreno et al., 2005). Además, los aminoácidos excitatorios pueden alterar el metabolismo de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario (Delyfer et al., 2005). Por tanto, este aumento en los niveles de glutamato podría estar afectando, directa o indirectamente, sobre la electrofisiología ocular de los animales tratados con cocaína.

Un estudio realizado por Angehagen y colaboradores mostró la capacidad del topiramato para proteger frente a la neurotoxicidad inducida por glutamato (Angehagen et al., 2003). Esta capacidad del topiramato, así como su acción sobre canales de sodio y calcio, podría explicar que en el grupo cocaína-topiramato no se observe aumento en los niveles de glutamato, ni disminución en la amplitud de la onda a del ERG. No obstante, es muy importante seguir realizando estudios a este respecto con diferentes modelos de administración de topiramato.

Además, se ha encontrado una correlación significativamente positiva entre la concentración de glutamato y la actividad de la GSH-Px (Figura 39). Este resultado puede sugerir que el ojo está preparado para defenderse frente a la toxicidad del glutamato incrementando sus defensas antioxidantes. Probablemente, con una mayor exposición a cocaína se podrían haber observado más signos evidentes de cambios en los parámetros relacionados con estrés oxidativo. De hecho, Yoles y colaboradores observaron un efecto similar, ya que cuando ellos inyectaban cantidades subtóxicas de glutamato en el cuerpo vítreo de ojos de ratas, se activaba una señal de transducción con incremento en la expresión de bcl-2, que comenzaba a las 24 horas y duraba al menos 4 días (Yoles et al., 2001).

VI. CONCLUSIONES

- 1) El tratamiento crónico con etanol produce un aumento en el tiempo implícito de la onda a del ERG y de los PEV, y una disminución de la amplitud de la onda b del ERG y de los PEV. La administración de naltrexona no consigue evitar las alteraciones producidas por el etanol tanto en la amplitud de la onda b, como en el tiempo implícito de los PEV.
- 2) La retirada de la dieta alcohólica 24 horas antes del sacrificio permite la normalización de la concentración de MDA en el ojo, no así las variaciones electrofisiológicas observadas.
- 3) La administración de cocaína provoca una disminución en la amplitud de la onda a del ERG, mientras que el tratamiento con topiramato previene dicho cambio en la electrofisiología de la retina.
- 4) El tratamiento con cocaína produce aumento en los niveles de glutamato de la retina, mientras que esta alteración no se produce en los animales a los que se les administró topiramato. Además, existe una correlación significativamente positiva entre la concentración de glutamato y la actividad de la GSH-Px

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg E, Hofstetter CP, Olson L, Brené S (Moderate ethanol consumption increases hippocampal cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:557-567.2005).
- Akhondzadeh S, Hampa AD (Topiramate prevents ecstasy consumption: a case report. *Fundam Clin Pharmacol* 19:601-602.2005).
- Altshuler HL, Phillips PE, Feinhandler DA (Alteration of ethanol self-administration by naltrexone. *Life Sci* 26:679-688.1980).
- Ambati J, Chalam KV, Chawla DK, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ, Vanderlinde RE, Ambati BK (Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 115:1161-1166.1997).
- Anderson N, Oliver MN (Oral topiramate effective for alcoholism. *J Fam Pract* 52:682-683,687.2003).
- Anderson RE, Maude MB, Nielsen JC (Effect of lipid peroxidation on rhodopsin regeneration. *Curr Eye Res* 4:65-71.1985).
- Angehagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E (Topiramate protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res* 54:63-71.2003).
- Anton RF, Drobos DJ, Voronin K, Durazo-Avizu R, Moak DH (Naltrexone effects on alcohol consumption in a clinical laboratory paradigm: temporal effects of drinking. *Psychopharmacology (Berl)* 173:32-40.2004).
- Anton RF, Moak DH, Waid R, Latham P, Malcolm RJ, Dias JK (Naltrexone and cognitive behavioral therapy for the treatment of outpatient alcoholics: results of a placebo-controlled trial. *Am J Psychiatr* 156:1758-1764.1999).
- Anton RF, O'Malley SA, Ciraulo DA, Cisler RA, Couper D, Donovan DM, Gastfriend DR, Hosking JD, Johnson BA, LoCastro JS, Longabaugh R, Mason BJ, Mattson ME, Miller WR, Pettinati HM, Randall CL, Swift R, Weiss RD, Williams LD, Zweben A (Combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence: the COMBINE study: a randomized controlled trial. *JAMA* 295:2003-2017.2006).
- Anton RF, Oroszi G, O'Malley S, Couper D, Swift R, Pettinati H, Goldman D (An evaluation of μ -Opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence (COMBINE) study. *Arch Gen Psychiatry* 65:135-144.2008).
- Antonowicz K, Lenkiewicz E (Post-alcoholic neuropathy of the optic nerve. *Klin Oczna* 96:161-162.1994).
- Aquilera Y, Dorado ME, Prada FA, Martínez JJ, Quesada A, Ruiz-Gutiérrez V (The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. *Exp Eye Res* 80:535-543.2005).
- Aragón C, Sanchis-Segura C, Miquel M, Correa M (Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones: revista de sociodrogalcohol* 14:23-42.2002).
- Arenzana FJ, Carvan MJ, Aijón J, Sánchez-González R, Arévalo R, Porteros A (Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol* 28:342-348.2006).
- Arnone D (Review of the use of topiramate for treatment of psychiatric disorders. *Annals of General Psychiatry* 4:1-14.2005).
- Ascaso FJ, Cruz N, Del Buey MA, Cristóbal JA (An unusual case of cocaine-induced maculopathy. *Eur J Ophthalmol* 19:880-882.2009).

- Asensio-Sánchez VM, Torreblanca-Agüera B, Martínez-Calvo S, Calvo MJ, Rodríguez R (Severe ocular side effects with topamax. *Arch Soc Esp Oftalmol* 81:345-348.2006).
- Ashwell KW, Zhang LL (Optic nerve hypoplasia in an acute exposure model of the fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol* 16:161-167.1994).
- Aviñó J, Díaz-Llopis M, Espana E, Johnsen-Soriano S, Romero B, Marin N, Muriach M, Bosch-Morell F, Romero FJ (Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the optic nerve of rats. *Arch Soc Esp Oftalmol* 77:263-268.2002).
- Awatramani G, Wang J, Slaughter MM (Amacrine and ganglion cell contributions to the electroretinogram in amphibian retina. *Vis Neurosci* 18:147-156.2001).
- Baltieri DA, Daró FR, Ribeiro PL, Andrade AG (Effects of topiramate or naltrexone on tobacco use among male alcohol-dependent outpatients. *Drug and Alcohol Dependence* 105:33-41.2009).
- Banta JT, Hoffman K, Budenz DL, Ceballos E, Greenfield DS (Presumed topiramate-induced bilateral acute angle-closure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 132:112-114.2001).
- Barnett NL, Osborne NN (Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage. *Exp Eye Res* 61:83-90.1995).
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624.1990).
- Behrens M (Differential diagnosis of optic neuritis. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 208:193-203.1983).
- Bencherif B, Wand GS, McCaul ME, Kim YK, Ilgin N, Dannals RF, Frost JJ (Mu-opioid receptor binding measured by [¹¹C]carfentanil positron emission tomography is related to craving and mood in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 55:255-262.2004).
- Benítez del Castillo JM, Pérez Salvador JL, Benítez del Castillo Sánchez J, Pérez-Salvador García E (2002) Manual básico de electrofisiología ocular: sus aplicaciones en la práctica clínica. Madrid: MacLine, S.L.
- Benjamin D, Grant ER, Pohorecky LA (Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res* 621:137-140.1993).
- Berger H (Über des elektrenkephalogramm des menchen. *Archiv für Psychiatrie* 87:527-570.1929).
- Bilotta J, Saszik S, Givin CM, Hardesty HR, Sutherland SE (Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicol Teratol* 24:759-766.2002).
- Block SS, Moore BD, Scharre JE (Visual anomalies in young children exposed to cocaine. *Optom Vis Sci* 74:28-36.1997).
- Bobes J, Carreño JE, Gutiérrez CE, San Narciso GI, Antuña MJ, Díaz T, Fernández JJ, Cerceda A, Álvarez CE, Marina P, García-García M (Study of effectiveness of craving control with topiramate in patients with substance dependence disorders. *Actas Esp Psiquiatr* 32:299-306.2004).
- Bolla KI, Cadet J-L, London ED (The Neuropsychiatry of chronic cocaine abuse. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10:280-289.1998).
- Booyse FM, Parks DA (Moderate wine and alcohol consumption: beneficial effects on cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 86:517-528.2001).

- Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debré P, Gandjbakhch I (The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26:932-938.2004).
- Boyes WK, Hetzler BE, Dyer RS (Acute effects of ethanol on pattern reversal and flash-evoked potentials in rats and the relationship to body temperature. *Int J Psychophysiol* 14:27-39.1993).
- Brandes JL (Practical use of topiramate for migraine prevention. *Headache* 45:S66-S73.2005).
- Brown JS, Papadopoulos G, Neumann PJ, Friedman M, Miller JD, Menzin J (Cost-effectiveness of topiramate in migraine prevention: results from a pharmacoeconomic model of topiramate treatment. *Headache* 45:1012-1022.2005).
- Brown KT, Watanabe K, Murakami M (The early and late receptor potencial of monkey cones and rods. *Cold Springs Harbour Symposia on Quantitative Biology* 30:457-482.1965).
- Brown KT, Wiesel TN (Localization of origins of electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *J Physiol* 158:257-280.1961).
- Brugal MT, Rodríguez-Martos A (Morbimortalidad asociada al consumo de drogas. *Adicciones* 18:5-8.2006).
- Burov IV, Treskov VG, Iukhananov RI, Kovalenko AK (Beta-endorphin and endogenous alcohol level of the blood in alcoholic patients. *Biull Eksp Biol Med* 98:578-579.1984).
- Bussone G, Diener HC, Pfeil J, Schwalen S (Topiramate 100mg/day in migraine prevention: a pooled analysis of double-blind randomised controlled trials. *Int J Clin Pract* 59:961-968.2005).
- Buttke TM, Sandstrom PA (Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7-10.1994).
- Camí J, Farré M, González ML, Segura J, de la Torre R (Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. Clinical and research implications. *Recent Dev Alcohol* 14:437-455.1998).
- Campistol J, Campos J, Casas C, Herranz JL (Topiramate in the prophylactic treatment of migraine in children. *J Child Neurol* 20:251-253.2005).
- Carones F, Brancato R, Venturi E, Bianchi S, Maqni R (Corneal endothelial anomalies in the fetal alcohol syndrome. *Arch Ophthalmol* 110:1128-1131.1992).
- Casson RJ, Wood JP, Melena J, Chidlow G, Osborne NN (The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 44:1348-1354.2003).
- Caton R (The electric currents of the brain. *British Journal of Medecine* 11:278.1875).
- Celesia GG (Anatomy and physiology of visual evoked potentials and electroretinograms. *Neurol Clin* 6:657-679.1988).
- Celesia GG, Bodis-Wollner I, Chatrian GE, Harding GFA, Sokol S, Spekreijse H (Recommended standards for electroretinograms and vidual evoked potentials. Report of an IFCN Committee. *Electroencephalography and clinical Neuro physiology* 87:421-436.1993).
- Cervantes-Munguía R, Espinosa-López L, Gómez-Contreras P, Hernández-Flores G, Domínguez-Rodríguez J, Bravo-Cuéllar A (Retinopathy of prematurity and oxidative stress. *An Pediatr (Barc)* 64:126-131.2006).

- Coulter DA, Sombati S, DeLorenzo RJ (Selective effects of topiramate on sustained and repetitive firing and spontaneous bursting in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 34:123.1993).
- Croop RS, Faulkner EB, Labriola DF (The safety profile of naltrexone in the treatment of alcoholism. Results from a multicenter usage study. The Naltrexone Usage Study Group. *Arch Gen Psychiatry* 54:1130-1135.1997).
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira RC (Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res Rev* 58:192-208.2008).
- Cunha-Vaz J (The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol* 23:279-296.1979).
- Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ (Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem* 5:3-14.2005).
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM (Xanthine oxidase as a source of free radicals damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 17:145-152.1985).
- Chan T, Howell R, O'Keefe M, Lanigan B (Ocular manifestations in fetal alcohol syndrome. *Br J Ophthalmol* 75:524-526.1991).
- Chappell RL, Schuette E, Anton R, Ripps H (GABA(C) receptors modulate the rod-driven ERG b-wave of the skate retina. *Doc Ophthalmol* 105:179-188.2002).
- Chen TC, Chao CW, Sorkin JA (Topiramate induced myopic shift and angle closure glaucoma. *Br J Ophthalmol* 87:648-649.2003).
- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatr* 156:11-18.1999).
- Chmielewski CE, Hernández LM, Quesada A, Pozas JA, Picabea L, Prada FA (Effects of ethanol on the inner layers of chick retina during development. *Alcohol* 14:313-317.1997).
- D'Amico D, Grazi L, Usai S, Moschiano F, Bussone G (Topiramate in migraine prophylaxis. *Neurol Sci* 26:S130-S133.2005).
- Dackis CA, O'Brien CP (Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J Subst Abuse Treat* 21:111-117.2001).
- Dangata YY, Kaufman MH (Morphometric analysis of the postnatal mouse optic nerve following prenatal exposure to alcohol. *J Anat* 191:49-56.1997).
- Daras M, Tuchman AJ, Marks S (Central nervous system infarction related to cocaine abuse. *Stroke* 22:1320-1326.1991).
- Davidson D, Palfai T, Bird C, Swift R (Effects of naltrexone on alcohol self-administration in heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 23:195-203.1999).
- Davidson D, Swift R, Fitz E (Naltrexone increases the latency to drink alcohol in social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 20:732-739.1996).
- Dawson WW, Parmer R, Hope GM (Division of the pattern-evoked retinal response by respiratory acidosis. *Vision Res* 28:363-369.1988).
- De Bernardi C, Ferraris S, D'Innella P, Do F, Torre E (Topiramate for binge eating disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:339-341.2005).
- de Lima Rde C, Carvalho F, Campos Sde B, Dantas H (Analysis of retinal nerve fiber layer in chronic tobacco and alcohol users. *Arg Bras Oftalmol* 69:323-325.2006).
- Delyfer MN, Forster V, Neveux N, Picaud S, Léveillard T, Sahel JA (Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the *rd1* mouse retina. *Mol Vis* 11:688-696.2005).

- Devenyi P, Schneiderman JF, Devenyi RG, Lawby L (Cocaine-induced central retinal artery occlusion. *CMAJ* 138:129-130.1988).
- Dewar J, McKendrick J (On the physiological action of light. *J Anat Physiol* 7:275.1873).
- DGPNSD (2007) Informe de la Encuesta Estatal sobre uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias (ESTUDES) 2006-2007. vol. <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/Estudes2006-2007.pdf> Madrid: Ministerio de Sanidad. Plan Nacional Sobre Drogas.
- DGPNSD (2008) Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2007/08. Madrid: Ministerio de Sanidad. Plan Nacional Sobre Drogas.
- DGPNSD (2010a) Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2009/2010. Madrid: Ministerio de Sanidad. Plan Nacional Sobre Drogas.
- DGPNSD (2010b) Informe de la Encuesta Estatal sobre uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias (ESTUDES) 2010. Madrid: Ministerio de Sanidad. Plan Nacional Sobre Drogas.
- DGPNSD (2012) Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2010/2012. Madrid: Ministerio de Sanidad. Plan Nacional Sobre Drogas.
- Dhuna A, Pascual-Leone A, Langendorf F, Anderson DC (Epileptogenic properties of cocaine in humans. *Neurotoxicology* 12:621-626.1991).
- Di Chiara G, Imperato A (Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of reely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274-5278.1988).
- Diamond M, Dahlöf C, Papadopoulos G, Neto W, Wu SC (Topiramate improves health-related quality of life when used to prevent migraine. *Headache* 45:1023-1030.2005).
- Dick E, Miller RF (Light-evoked potassium activity in mudpuppy retina: its relationship to the b-wave of the electroretinogram. *Brain Res* 154:388-394.1978).
- Dick E, Miller RF (Extracellular K⁺ activity changes related to electroretinogram components. I. Amphibian (I-Type) retinas. *J Gen Physiol* 85:885-908.1985).
- Dick E, Miller RF, Bloomfield S (Extracellular K⁺ activity changes related to electroretinogram components. II. Rabbit (E-Type) retinas. *J Gen Physiol* 85:911-931.1985).
- Dickenson AH, Ghandehari J (Anti-convulsants and anti-depressants. *Handb Exp Pharmacol* 177:145-177.2007).
- Dlugos CA, Rabin RA (Ocular deficits associated with alcohol exposure during zebrafish development. *J Comp Neurol* 502:497-506.2007).
- Dong CJ, Hare WA (Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. *Vision Res* 40:579-589.2000).
- Dong CJ, Hare WA (GABA_c feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b-wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res* 42:1081-1087.2002).
- Doose DR, Walker SA, Gisclon LG, Nayak RK (Single-dose pharmacokinetics and effect of food on the bioavailability of topiramate, a novel antiepileptic drug. *J Clin Pharmacol* 36:884-891.1996).
- Dringen R (Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.2000).

- Drobes DJ, Anton RF, Thomas SE, Voronin K (Effects of naltrexone and nalmefene on subjective response to alcohol among non-treatment-seeking alcoholics and social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1362-1370.2004).
- Dunphy EB (Alcohol and tobacco amblyopia: a historical survey. XXXI DeSchweinitz lecture. *Am J Ophthalmol* 68:569-578.1969).
- Dupont I, Bodénez P, Berthou F, Simon B, Bardou LG, Lucas D (Cytochrome P-450 2E1 activity and oxidative stress in alcoholic patients. *Alcohol Alcohol* 35:98-103.2000).
- Eckstein AK, Reichenbach A, Jacobi P, Weber P, Gregor M, Zrenner E (Hepatic retinopathy. Changes in retinal function. *Vision Res* 37:1699-1706.1997).
- Einthoven W, Jolly WA (The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities. *Quart J Exp Physiol* 1:373-416.1908).
- Faber DS (1969) Ph D Thesis. Buffalo, N Y: State University of New York.
- Fahey RC, Buschbacher RM, Newton GL (The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J Mol Evol* 25:81-88.1987).
- Farré M, de la Torre R, González ML, Terán MT, Roset PN, Menoyo E, Camí J (Cocaine and alcohol interactions in humans: neuroendocrine effects and cocaethylene metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283:164-176.1997).
- Farré M, de la Torre R, Llorente M, Lamas X, Ugena B, Segura J, Camí J (Alcohol and cocaine interactions in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1364-1373.1993).
- Ferriero DM, Sheldon RA, Domingo J (Somatostatin is altered in developing retina from ethanol-exposed rats. *Neurosci Lett* 147:29-32.1992).
- Fhager B, Meiri IM, Sjögren M, Edman A (Treatment of aggressive behavior in dementia with the anticonvulsant topiramate: a retrospective pilot study. *Int Psychogeriatr* 15:307-309.2003).
- Fillebeen C, Pantopoulos K (Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7:15-22.2002).
- Fraunfelder FW, Freunfelder FT (Adverse ocular drug reactions recently identifies by the National Registry of Drug-Induced Ocular Side Effects. *Ophthalmology* 111:1275-1279.2004).
- Fredericks RK, Lefkowitz DS, Challa VR, Troost BT (Cerebral vasculitis associated with cocaine abuse. *Stroke* 22:1437-1439.1991).
- Fridovich I (Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.1983).
- Gabig TG, Babior BM (The O₂(-) forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.1979).
- Garavan H, Pankiewicz J, Bloom A, Cho J-K, Sperry L, Ross TJ, Salmeron BJ, Risinger R, Kelley D, Stein E (Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *Am J Psychiatr* 157:1789-1798.2000).
- Garbutt JC, Kranzler HR, O'Malley S, Gastfriend DR, Pettinati H, Silverman BL, Loewy JW, Ehrich EW (Efficacy and tolerability of long-acting injectable naltrexone for alcohol dependence: a randomized controlled trial. *JAMA* 293:1617-1625.2005).
- Gasior M, Kaminski R, Witkin JM (Pharmacological modulation of GABA(B) receptor affects cocaine-induced seizures in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 174:211-219.2004).

- Gasior M, Ungard JT, Witkin JM (Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. *JPET* 290:1148-1156.1999).
- Gass JT, Olive MF (Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75:218-265.2008).
- Gatto EM, Roca MC, Raina G, Micheli F (Low doses of topiramate are effective in essential tremor: a report of three cases. *Clin Neuropharmacol* 26:294-296.2003).
- George MA, Anton RF, Bloomer C, Teneback C, Drobos DJ, Lorberbaum JP, Nahas Z, Vincent DJ (Activation of prefrontal cortex and anterior thalamus in alcoholic subjects on exposure to alcohol-specific cues. *Arch Gen Psychiatry* 58:345-352.2001).
- Gianoulakis C (Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 180:21-29.1990).
- Gianoulakis C, Krishnan B, Thavundayil J (Enhanced sensitivity of pituitary beta-endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 53:250-257.1996).
- Gibbs JW, Sombati S, DeLorenzo RJ, Coulter DA (Cellular actions of topiramate: blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 41:S10-S16.2000).
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.1996).
- Gonzales RA, Weiss F (Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 18:10663-10671.1998).
- Good WV, Ferriero DM, Golabi M, Kobori JA (Abnormalities of the visual system in infants exposed to cocaine. *Ophthalmology* 99:341-346.1992).
- Goodwin FL, Campisi M, Babinska I, Amit Z (Effects of naltrexone on the intake of ethanol and flavored solutions in rats. *Alcohol* 25:9-19.2001).
- Gordey M, DeLorey TM, Olsen RW (Differential sensitivity of recombinant GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes to modulation by topiramate. *Epilepsia* 41:S25-S29.2000).
- Goss-Sampson MA, Kriss T, Muller DP (Retinal abnormalities in experimental vitamin E deficiency. *Free Radic Biol Med* 25:457-462.1998).
- Gottlob I, Wündsche L, Tuppy FK (The rabbit electroretinogram: effect of GABA and its antagonists. *Vision Res* 28:203-210.1988).
- Graham SH, Shimizu H, Newman A, Weinstein P, Faden AI (Opioid receptor antagonist nalmefene stereospecifically inhibits glutamate release during global cerebral ischemia. *Brain Res* 632:346-350.1993).
- Gryder DS, Rogawski MA (Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *J Neurosci* 23:7069-7074.2003).
- Hadjikoutis S, Morga JE, Wild JM, Smith PE (Ocular complications of neurological therapy. *Eur J Neurol* 12:499-507.2005).
- Halliwell B, Gutteridge JMC (Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514.1986).

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Hamard H, Desbordes J ([Iatrogenic pathology of the optic nerve]. *Annee Ther Clin Ophthalmol* 33:1982).
- Hardy K, Hunt NH (Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 37:1550-1563.2004).
- Hedges DW, Reimherr FW, Hoopes SP, Rosenthal NR, Kamin M, Karim R, Capece JA (Treatment of bulimia nervosa with topiramate in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, part 2: improvement in psychiatric measures. *J Clin Psychiatry* 64:1449-1454.2003).
- Heiling M, Egli M (Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther* 111:855-876.2006).
- Hemby SE (Recent advances in the biology of addiction. *Curr Psychiatry Rep* 1:159-165.1999).
- Hermenegildo C, Raya A, Romá J, Romero FJ (Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 18:893-896.1993).
- Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, García-Verdugo JM (Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: Protective effects of an antioxidant. *PNAS* 100:7919-7924.2003).
- Hilton EJ, Hosking SL, Betts T (The effect of antiepileptic drugs on visual performance. *Seizure* 13:113-128.2004).
- Holman BL, Mendelson J, Garada B, Teoh SW, Hallingring E, Johnson KA, Mello NK (Regional cerebral blood flow improves with treatment in chronic cocaine polydrug users. *J Nucl Med* 34:723-727.1993).
- Hölmgren F (Method att objektivera effecten an ljusintyck på retina. *Upsala läkaref förh* 1:1777.1865).
- Hoyt C (Vitamin metabolism and therapy in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 24:177-190.1979).
- Hsu WM, Chen SS, Peng CH, Chen CF, Ko YC, Tsai DC, Chou CK, Ho LL, Chiou SH, Liu JH (Elevated nitric oxide level in aqueous humor of AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Ophthalmologica* 217:298-301.2003).
- Hug TE, Fitzgerald KM, Cibis GW (Clinical and electroretinographic findings in fetal alcohol syndrome. *J AAPOS* 4:200-204.2000).
- Ioannides-Demos LL, Pronietto J, McNeil JJ (Pharmacotherapy for obesity. *Drugs* 65:1391-1418.2005).
- Jacobsen LK, Staley JK, Malison RT, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Innis RB (Elevated central serotonin transporter binding availability in acutely abstinent cocaine-dependent patients. *Am J Psychiatry* 157:1134-1140.2000).
- Jaffe AJ, Rounsaville B, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, O'Malley SS (Naltrexone, relapse prevention, and supportive therapy with alcoholics: an analysis of patient treatment matching. *J Consult Clin Psychol* 64:1044-1053.1996).
- Janowsky DS, Kraus JE, Barnhill J, Elamir B, Davis JM (Effects of topiramate on aggressive, self-injurious, and disruptive/destructive behaviors in the intellectually disabled: an open-label retrospective study. *J Clin Psychopharmacol* 23:500-504.2003).

- Ji D, Gilpin NW, Richardson HN, Rivier CL, Koob GF (Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on binge-like alcohol drinking in rats. *Behav Pharmacol* 19:1-12.2008).
- Jimenez-Rivera CA, Waterhouse BD (Effects of systemically and locally applied cocaine on cerebrocortical neuron responsiveness to afferent synaptic inputs and glutamate. *Brain Res* 546:287-296.1991).
- Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Miranda M, Asensio S, Barcia J, Romá J, Monfort P, Felipe V, Romero FJ (Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res* 31:486-492.2007a).
- Johnsen-Soriano S, Genovés JM, Romero B, Muriach M, Sancho-Tello M, Bosch-Morell F, Romero FJ (Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen. *Arch Soc Esp Oftalmol* 82:757-762.2007b).
- Johnson BA (Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs* 19:873-896.2005).
- Johnson BA, Ait-Daoud N (Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl)* 149:327-344.2000).
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar FZ, Javors MA (Use of oral topiramate to promote smoking abstinence among alcohol-dependent smokers: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 165:1600-1605.2005).
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar FZ, Ma JZ (Oral topiramate reduces the consequences of drinking and improves the quality of life of alcohol-dependent individuals: a randomized controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 61:905-912.2004).
- Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ (Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet* 361:1677-1685.2003).
- Jones KL, Smith DW (Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302:999-1001.1973).
- Juárez J (2004) Neurobiología de las adicciones. In: *Temas selectos de neurociencias III* (Velázquez, M., ed), pp 225-237 México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Kainz PM, Adolph AR, Wong KY, Dowling JE (Lazy eyes zebrafish mutation affects Müller glial cells, compromising photoreceptor function and causing partial blindness. *J Comp Neurol* 463:265-280.2003).
- Kalivas PW, Duffy P (Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem* 70:1497-1502.1998).
- Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA (Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 46:1097-1104.2004).
- Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, O'Brien CP (A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 75:233-240.2004).
- Kaplan LM (Pharmacological therapies for obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 35:91-104.2005).
- Karch SB (1993) *The pathology of drug abuse*. Boca Raton: CRC Press.

- Karch SB (2002) Cocaine. In: Karch's pathology of drug abuse(Karch, S. B., ed), pp 1-187 Boca Raton: CRC Press.
- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, Blecha L, Lowenstein W, Martinot JL, Reynaud M, Lépine JP (New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:425-438.2008a).
- Karila L, Weinstein A, Benyamina A, Coscas S, Leroy C, Noble F, Lowenstein W, Aubin HJ, Lépine JP, Reynaud M (Current pharmacotherapies and immunotherapy in cocaine addiction. *Presse Med* 37:689-698.2008b).
- Karler R, Calder LD, Thai LH, Bedingfield JB (A dopaminergic-glutamatergic basis for the action of amphetamine and cocaine. *Brain Res* 658:8-14.1994).
- Karwoski CJ, Newman EA, Shimazaki H, Proenza LM (Light-evoked increases in extracellular K⁺ in the plexiform layers of amphibian retinas. *J Gen Physiol* 86:189-213.1985).
- Kas J, Blattna J (Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol* 32:81-92.1986).
- Kashyap B, Frederickson LC, Stenkamp DL (Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Vis Neurosci* 24:409-421.2007).
- Katz LM, Foxt DA (Prenatal ethanol exposure alters scotopic and photopic components of adult rat electroretinograms. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2861-2872.1991).
- Kelley JT, Pena Y, Reilly EL, Overall JE, Colton GS (Effects of age and alcohol abuse on pattern reversal visual evoked potentials. *Clin Electroencephalogr* 15:102-109.1984).
- Kenna GA, Nielsen DM, Mello P, Schiesl A, Swift RM (Pharmacotherapy of dual substance abuse and dependence. *CNS Drugs* 21:213-137.2007).
- Kennedy LA, Elliott MJ (Ocular changes in the mouse embryo following acute maternal ethanol intoxication. *Int J Dev Neurosci* 4:311-317.1986).
- Keyser KT, Britto LR, Schoepfer R, Whiting P, Cooper J, Conroy W, Brozowska-Prechtl A, Karten HJ, Lindstrom J (Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci* 13:442-454.1993).
- Khazaal Y, Cornuz J, Bilancioni R, Zullino DF (Topirimate for smoking cessation. *Psychiatry Clin Neurosci* 60:384-388.2006).
- Kiefer F, Horntrich M, Jahn H, Wiedemann K (Is withdrawal-induced anxiety in alcoholism based on beta-endorphin deficiency? *Psychopharmacology (Berl)* 162:433-437.2002).
- King AC, Volpicelli JR, Gunduz M, O'Brien CP, Kreek MJ (Naltrexone biotransformation and incidence of subjective side effects: a preliminary study. *Alcohol Clin Exp Res* 21:906-909.1997).
- Kjellström C, Conradi NG (Decreased axonal calibres without axonal loss in optic nerve following chronic alcohol feeding in adult rats: a morphometric study. *Acta Neuropathol* 85:117-121.1993).
- Kjellström S, Bruun A, Isaksson B, Eriksson T, Andréasson S, Ponjavic V (Retinal function and histopathology in rabbits treated with topiramate. *Doc Ophthalmol* 113:179-186.2006).
- Kline RP, Ripps H, Dowling JE (Generation of b-wave currents in the skate retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5727-5731.1978).
- Klonoff DC, Andrews MD, Obana WG (Stroke associated with cocaine use. *Arch Neurology* 46:989-993.1989).

- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA (Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20:5733-5740.2000).
- Kolb H (How the retina works. *Amer Sci* 91:28-35.2003).
- Kolb H, Fernández E, Nelson R (2005) *WebVision. The organization of the retina and visual system.*: John Moran Eye Center. University of Utah.
- Komanduri R (Two cases of alcohol craving curbed by topiramate. *J Clin Psychiatry* 64:612.2003).
- Koob GF (Cocaine reward and dopamine receptors: love at first site. *Arch Gen Psychiatry* 56:1107-1108.1999).
- Koob GF (Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 27:232-243.2003).
- Koob GF, Nestler EJ (The neurobiology of drug adicción. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:482-497.1997).
- Kosower NS, Kosower EM (The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109-160.1978).
- Kosten TR, Malison R, Wallace E (1996) Neuropsychological abnormalities in cocaine abusers: possible correlates in SPECT neuroimaging. In: *Neurotoxicity and neuropathology associated with cocaine abuse*(Majewska, M. D., ed), pp 175-192 Rockville: National Institute on Drug Abuse.
- Koulen P, Brandstätter JH, Enz R, Bormann J, Wässle H (Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. *Eur J Neurosci* 10:115-127.1998).
- Kramer LD, Locke GE, Ogunyemi A, Nelson L (Cocaine-related seizures in adults. *Am J Drug Alcohol Abuse* 16:307-317.1990).
- Kranzler HR, Tennen H, Armeli S, Chan G, Covault J, Arias A, Oncken C (Targeted naltrexone for problem drinkers. *J Clin Psychopharmacol* 29:350-357.2009).
- Krupitsky EM, Rudenko AA, Burakov AM, Slavina TY, Grinenko AA, Pittman B, Gueorguieva R, Petrakis IL, Zvartau EE, Krystal JH (Antiglutamatergic strategies for ethanol detoxification: comparison with placebo and diazepam. *Alcohol Clin Exp Res* 31:604-611.2007).
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK (Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:768-787.1966).
- Kuzniecky R, Hetherington H, Ho S, Pan J, Martin R, Gilliam F, Hugg J, Faught E (Topiramate increases cerebral GABA in healthy humans. *Neurology* 51:627-629.1998).
- Landmark CJ (Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Med Sci Monit* 13:RA1-7.2007).
- Larimer ME, Palmer RS, Marlatt GA (Relapse prevention. An overview of Marlatt's cognitive-behavioral model. *Alcohol Res Health* 23:151-160.1999).
- Lathers CM, Tyau LS, Spino MM, Agarawal I (Cocaine-induced seizures, arrhythmias and sudden death. *J Clin Pharmacol* 28:584-593.1988).
- Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF (Hepatic cytosolic non-selenium dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 108:981-987.1978).
- LeDoux JE (Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.2000).
- Leung IY, Lai S, Ren S, Kempen J, Klein R, Tso MO, Lai HC (Early retinal vascular abnormalities in African-American cocaine users. *Am J Ophthalmol* 146:612-619.2008).

- Levine AS, Grace MK, Cleary JP, Billington CJ (Naltrexone infusion inhibits the development of preference for a high-sucrose diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R1149-R1154.2002).
- Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I (Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res* 74:615-625.2002).
- Li SY, Gomelsky M, Duan J, zhang Z, Gomelsky L, Zhang X, Epstein PN, Ren J (Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene prevents acetaldehyde-induced cell injury in human umbilical vein endothelial cells: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279:11244-11252.2004).
- Lin J, Fosnot J, Edmond J (Bilateral angle closure glaucoma in a child receiving oral topiramate. *J AAPOS* 7:66-68.2003).
- Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P (Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones* 13:37-45.2001).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.1951).
- Maier K, Rau CR, Storch MK, Sattler MB, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert AV, Bahr M, Diem R (Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol* 14:378-387.2004).
- Marc RE (1994) Visualizing amino acids in the retina. In: *Great Bain Visual Science Symposium*, vol. 1, pp 58-68 University of Utah.
- Marks V, Chapple P (Hepatic dysfunction in heroin and cocaine users. *Br J Addict* 62:189-195.1967).
- Marmor MF (Clinical electrophysiology of the retinal pigment epithelium. *Doc Ophthalmol* 76:301-313.1991).
- Marmor MF (1999) The retinal pigment epithelium. In: *Ophthalmology*(Yanoff, M. and Duker, J., eds), pp 8.2.1-4 Londres: Mosby.
- Marmor MF, Zrenner E (Standard for clinical electroretinography (1999 update). International Society for Clinical Electrophysiology of vision. *Doc Ophthalmol* 97:143-156.1999).
- Maryanoff BE, Nortey SO, Gardocki JF, Shank RP, Dodgson SP (Anticonvulsant O-alkyl sulfamates. 2,3:4,5-Bis-O-(1-methylethylidene)-beta-D-fructopyranose sulfamate and related compounds. *J Med Chem* 30:880-887.1987).
- Massey SC (Cells types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog Ret Res* 9:399-425.1990).
- Matsui JI, Egana AL, Sponholtz TR, Adolph AR, Dowling JE (Effects of ethanol on photoreceptors and visual function in developing zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4589-4597.2006).
- McCord JM, Roy RS (The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 60:1346-1352.1982).
- Mehanny SZ, Abdel-Rahman M (Cocaine hepatotoxicity in mice: Histologic and enzymatic studies. *Toxicol Pathology* 19:24-29.1991).
- Meinck H, Adler L ([Optic nerve diseases in alcohol dependence early recognition by visual evoked potentials]. *Nervenarzt* 53:644-646.1982).
- Meister A, Anderson ME (Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.1983).

- Méndez-Armenta M, Barroso-Moquel R, Villeda-Hernández J, Romero-Díaz V, Ríos C (Retinal lesions in rat fetuses prenatally exposed to cocaine. *Neurotoxicol Teratol* 19:199-203.1997).
- Michaelides M, Larkin G (Cocaine-associated central retinal artery occlusion in a young man. *Eye* 16:790-792.2002).
- Middaugh LD, Szumlinski KK, Van Patten Y, Marlowe AL, Kalivas PW (Chronic ethanol consumption by C57BL/6 mice promotes tolerance to its interoceptive cues and increases extracellular dopamine, an effect blocked by naltrexone. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1892-1900.2003).
- Miller MT, Epstein RJ, Sugar J, Pinchoff BS, Sugar A, Gammon JA, Mittelman D, Dennis RF, Israel J (Anterior segment anomalies associated with the fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 21:8-18.1984).
- Miller MT, Israel J, Cuttone J (Fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 18:6-15.1981).
- Miller RF, Dowling JE (Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 33:323-341.1970).
- Miranda M, Bosch-Morell F, Belda JI, García-Manzanares MD, Barcia JM, Alió JL, Romero FJ (Protective effect of viscoelastic against retina lipid peroxidation. *Ophthalmic res* 39:260-264.2007).
- Miranda M, Muriach M, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Araiz J, Romá J, Romero FJ (Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol*.2004).
- Mizutani M, Gerhardinger C, Loranzi M (Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 47:445-449.1998).
- Monterosso JR, Flannery BA, Pettinati H, Oslin DW, Rukstalis M, O'Brien CP, Volpicelli JR (Predicting treatment response to naltrexone: the influence of craving and family history. *Am J Addict* 10:258-268.2001).
- Moreno MC, Sande P, Marcos HA, de Zavalía N, Keller-Sarmiento MI, Rosenstein RE (Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB J* 19:1161-1162.2005).
- Muriach M, López-Pedrajas R, Barcia JM, Sánchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ (Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem*.2010).
- Myrick H, Anton RF, Li X, Henderson S, Randall PK, Voronin K (Effect of naltrexone and ondansetron on alcohol cue-induced activation of the ventral striatum in alcohol-dependent people. *Arch Gen Psychiatry* 65:466-475.2008).
- Nazliel B, Arkan Z, Irkec C (Visual evoked potentials in chronic alcoholism. *Addict Behav* 32:1470-1473.2007).
- Nemet A, Neshet R, Almog Y, Assia E (Bilateral acute angle closure glaucoma following topiramate treatment. *Harefuah* 141:597-599.2002).
- Nestler EJ (Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.2001).
- Nestler EJ (Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8:1445-1449.2005).
- Newman EA (Current source-density analysis of the b-wave of frog retina. *J Neurophysiol* 43:1355-1366.1980).

- Newman EA (Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. *Brain Res* 498:308-314.1989).
- Nickel MK, Nickel C, Kaplan P, Lahmann C, Mühlbacher M, Tritt K, Krawczyk J, Leiberich PK, Rother WK, Loew TH (Treatment of aggression with topiramate in male borderline patients: a double-blind, placebo-controlled study. *Biol Psychiatry* 57:495-499.2005).
- Nordmann R (Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol* 29:513-522.1994).
- Numa R, Baron M, Kohen R, Yaka R (Tempol attenuates cocaine-induced death of PC12 cells through decreased oxidative damage. *Eur J Pharmacol* 650:157-162.2011).
- Numa R, Kohen R, Poltyrev T, Yaka R (Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization. *Neuroscience* 155:649-658.2008).
- O'Brien CP (2006) Drug addiction and drug abuse. In: *The pharmacological basis of therapeutics*(Brunton, L. L. et al., eds), pp 607-627 New York: McGrawHill.
- O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B (Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 49:881-887.1992).
- O'Malley SS, Krishnan-Sarin S, Farren C, Sinha R, Kreek MJ (Naltrexone decreases craving and alcohol self-administration in alcohol-dependent subjects and activates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Psychopharmacology (Berl)* 160:19-29.2002).
- Oakley B, Katz BJ, Xu Z, Zheng J (Spatial buffering of extracellular potassium by Müller (glial) cells in the toad retina. *Exp Eye Res* 55:539-550.1992).
- OEDT (2007) Informe anual 2007: El problema de las drogodependencias en Europa. Lisboa: Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J (Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.2004).
- Oslin DW, Berrettini W, Kranzler HR, Pettinati H, Gelernter J, Volpicelli JR, O'Brien CP (A functional polymorphism of the mu-opioid receptor gene is associated with naltrexone response in alcohol-dependent patients. *Neuropsychopharmacology* 28:1546-1552.2003).
- Parés A, Caballería J (*Patología Orgánica. Adicciones* 14:155-174.2002).
- Parnell SE, Dehart DB, Wills TA, Chen SY, Hodge CW, Besheer J, Waage-Baudet HG, Charness ME, Sulik KK (Maternal oral intake mouse model for fetal alcohol spectrum disorders: ocular defects as a measure of effect. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1791-1798.2006).
- Parson SH, Dhillon B, Findlater GS, Kaufman MH (Optic nerve hypoplasia in the fetal alcohol syndrome: a mouse model. *J Anat* 186:313-320.1995).
- Parson SH, Sojitra NM (Loss of myelinated axons is specific to the central nervous system in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Anat* 187:739-748.1995).
- Patel M (Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 1951-1962.2004).
- Pawlosky RJ, Bacher J, Salem NJ (Ethanol consumption alters electroretinograms and depletes neural tissues of docosahexaenoic acid in rhesus monkeys: nutritional consequences of a low n-3 fatty acid diet. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1758-1765.2001).

- Peachey NS, Quiambao AB, Xu Q, Pardue MT, Roveri L, McCall MA, Al-Ubaidi MR (Loss of bipolar cells resulting from the expression of bcl-2 directed by the IRBP promoter. *Exp Eye Res* 77:477-483.2003).
- Peterson GL (A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.1977).
- Petroff OA, Hyder F, Mattson RH, Rothman DL (Topiramate increases brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in patients with epilepsy. *Neurology* 52:473-478.1999).
- Pichot P, López-Ibor Aliño JJ, Valdés Miyar M (eds.) (1995) DSM-IV. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Barcelona: MASSON.
- Pinazo-Duran MD, Renau-Piqueras J, Guerri C, Strömmland K (Optic nerve hypoplasia in fetal alcohol syndrome: an update. *Eur J Ophthalmol* 7:262-270.1997).
- Platt JJ (1997) Cocaine addiction. Theory, research and treatment. Cambridge: Harvard University Press.
- Pons S, Zanón-Moreno VC, Melo P, Vila V, Gallego-Pinazo R, Pinazo-Duran MD (Optic neuropathy induced by prenatal drug or alcohol exposure. *Arch Soc Esp Oftalmol* 82:21-26.2007).
- Preti A (New developments in the pharmacotherapy of cocaine abuse. *Addict Biol* 12:133-151.2007).
- Privitera (Topiramate: a new antiepileptic drug. *Ann Pharmacother* 31:1164-1173.1997).
- Ramachandran V, Watts LT, Maffi SK, Chen J, Schenker S, Henderson G (Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 74:577-588.2003).
- Ramos JA, Collazos F, Casas M (2005) Adicciones a sustancias químicas (III). In: Tratado de Psiquiatría (Vallejo, J. and Leal, C., eds), pp 786-805 Barcelona: Ars Médica.
- Ranchon I, La Vail MM, Kotake Y, Anderson RE (Free radical trap phenyl-N-tert-butyl nitron protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J Neurosci* 23:6050-6057.2003).
- Ray LA, Oslin DW (Naltrexone for the treatment of alcohol dependence among African Americans: results from the COMBINE Study. *Drug and Alcohol Dependence* 105:256-258.2009).
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.1980).
- Repetto M, Gold MS (2005) Cocaine and crack, neurobiology. In: Substance abuse (Lowinson, J. H. and *et al*, eds), pp 195-218 Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Resende LA, Adoni T, Kimaid PA, Ragazzo P, Ehlers JA (Effects of ethanol on human visual evoked potentials. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 41:349-352.2001).
- Rhee DJ, Goldberg MJ, Parrish RK (Bilateral angle-closure glaucoma and ciliary body swelling from topiramate. *Arch Ophthalmol* 119:1721-1723.2001).
- Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A (High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 577:9-18.1992).

- Riggs LA (Electroretinography in cases of night blindness. *Proc Soc Exp Biol Med* 48:204.1941).
- Rinder HM, Ault KA, Jatlow PI, Kosten TR, Smith BR (Platelet alpha-granule release in cocaine users. *Circulation* 90:1162-1167.1994).
- Robson JG, Frishman LJ (Dissecting the dark-adapted electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 95:187-215.1998-1999).
- Rockhold RW, Oden G, Ho IK, Andrew M, Farley JM (Glutamate receptor antagonists block cocaine-induced convulsions and death. *Brain Res Bull* 27:721-723.1991).
- Rogawski MA, Löscher W (The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553-564.2004).
- Romero MJ, Asensio S, Palau C, Sánchez A, Romero FJ (Cocaine addiction: diffusion tensor imaging study of the inferior frontal and anterior cingulate white matter. *Psychiatry Res* 30:57-63.2010).
- Room R, Babor T, Rhem J (Alcohol and Public Health. *Lancet* 365:519-530.2005).
- Roth S, Shaikh AR, Hennelly MM, Li Q, Bindokas V, Graham CE (Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *IOVS* 44:5383-5395.2003).
- Roy M, Roy A, Williams J, Weinberger L, Smelson D (Reduced blue cone electroretinogram in cocaine-withdrawn patients. *Arch Gen Psychiatry* 54:153-156.1997).
- Roy M, Smelson DA, Roy A (Abnormal electroretinogram in cocaine-dependent patients. Relationship to craving. *Br J Psychiatry* 168:507-511.1996).
- Rozman C (1988) Alcoholismo, Psiquiatría. In: *Medicina Interna*, pp 1449-1452 Barcelona: Ediciones Doyma S.A.
- Rubio G, Ponce G, Jimenez-Arriero MA, Palomo T, Ferre F (Effectiveness of topiramate in control of alcohol craving. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:S63.2002).
- Rubio G, Ponce G, Jimenez-Arriero MA, Palomo T, Manzanares J, Ferre F (Effects of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry* 37:37-40.2004).
- Rubio G, Ponce G, Rodríguez-Jiménez R, Jiménez-Arriero MA, Hoenicka J, Palomo T (Clinical predictors of response to naltrexone in alcoholic patients: who benefits most from treatment with naltrexone? *Alcohol Alcohol* 40:227-233.2005).
- Saland LC, Comunas F, Maez D (Naltrexone induces melanocyte-stimulating hormone release and degenerative changes in pituitary innervation in amphibians. *Neuropeptides* 8:133-141.1986).
- Saland LC, Reyes E, Ortiz E (Naltrexone effects on pituitary neurointermediate lobe and median eminence. *Neurochem Res* 9:207-217.1984).
- Saland LC, Reyes E, Samora A, Gutiérrez L (Chronic naltrexone infusion: effects on innervation of rat neurointermediate lobe. *Brain Res Bull* 24:779-786.1990).
- Samples J, Younge B (Tobacco alcohol amblyopia. *J Clin Neuroophthalmol* 1:213-218.1981).
- Sancho-Tello M, Muriach M, Barcia J, Bosch-Morell F, Genovés JM, Johnsen-Soriano S, Romero B, Almansa I, Díaz-Llopis M, García-Delpech S, Romá J, Romero FJ (Chronic alcohol feeding induces biochemical, histological, and functional alterations in rat retina. *Alcohol Alcohol* 43:254-260.2008).
- Sankar PS, Pasquale LR, Grosskreutz CL (Uveal effusion and secondary angle-closure glaucoma associated with topiramate use. *Arch Ophthalmol* 119:1210-1211.2001).

- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D (Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis Factor- α and immunoglobulin G. *J Clin Invest* 92:1564-1571.1993).
- Scharank KS (1992) Cocaine-related emergency department presentations. In: National Institute on Drug Abuse Research Monograph Series 123 Acute Cocaine Intoxication: Current Methods and Treatment(Sorer, H., ed), pp 110-128 Rockville: U.S. Department of Health and Human Services.
- Scharmm H, Rebertson LW, Oesch F (Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 34:3735-3739.1985).
- Schlörff EC, Husain K, Somani SM (Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 18:203-214.1999).
- Schmitz JM, Stotts AL, Sayre SL, DeLaune KA, Grabowski J (Treatment of cocaine-alcohol dependence with naltrexone and relapse prevention therapy. *Am J Addict* 13:333-341.2004).
- Schneiderman JH (Topiramate: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Can J Neurol Sci* 25:S3-S5.1998).
- Schubert H (1999) Structure and function of the neural retina. In: *Ophthalmology*(Yanoff, M. and Duker, J. S., eds), pp 8.1.1.-4 Londres: Mosby.
- SENEC (2004) Condiciones generales de acreditación de procedimientos, proveedores y centros para pruebas funcionales de neurofisiología clínica: Potenciales evocados.: Sociedad Española de Neurofisiología Clínica.
- Severt L, Coulter DA, Sombati S, DeLorenzo RJ (Topiramate selectively blocks kainate currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 36:38.1995).
- Sherwood Brown E, Carmody TJ, Schmitz JM, Caetano R, Adinoff B, Swann AC, John Rush A (A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of naltrexone in outpatients with bipolar disorder and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1863-1869.2009).
- Shichi H, Somers RL, Yamamoto K (Rhodopsin kinase. *Methods Enzymol* 99:362-366.1983).
- Sies H (Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291-295.1997).
- Sies H, de Groot H (Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:547-551.1992).
- Silvia-Araújo A, Abreu-Dias P, Salgado-Borges J, Tavares MA (Retinal changes induced by neonatal cocaine exposure in the rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:162-166.1994).
- Silvia-Araújo A, Abreu-Dias P, Silva MC, Tavares MA (Effects of prenatal cocaine exposure in the photoreceptor cells of the rat retina. *Mol Neurobiol* 11:77-86.1995a).
- Silvia-Araújo A, Salgado-Borges J, Cardoso V, Silva MC, Castro-Correia J, Tavares MA (Changes in the retinal ganglion cell layer and optic nerve of rats exposed neonatally to cocaine. *Exp Eye Res* 56:199-206.1993).
- Silvia-Araújo A, Silva MC, Abreu-Dias P, Tavares MA (Effects of prenatal cocaine exposure in the retinal ganglion cell layer of the rat. A morphometric analysis. *Mol Neurobiol* 11:87-97.1995b).

- Silvia-Araújo A, Tavares MA (Development of the eye after gestational exposure to cocaine. Vascular disruption in the retina of rats and humans. *Ann N Y Acad Sci* 801:274-288.1996).
- Silvia-Araújo A, Tavares MA, Patacao MH, Carolino RM (Retinal hemorrhages associated with in utero exposure to cocaine. Experimental and clinical findings. *Retina* 16:411-418.1996).
- Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND (Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 1743:86-92.2005).
- Sitges M, Guarneros A, Nekrassov V (Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca²⁺ channel-mediated release of [3H]glutamate: comparison with the Na⁺ channel-mediated release. *Neuropharmacology* 53:854-862.2007).
- Slaughter MM, Miller RF (2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* 211:182-185.1981).
- Sleiman I, Manqili R, Semeraro F, Mazzilli S, Spandrio S, Balestrieri GP (Cocaine-associated retinal vascular occlusion: report of two cases. *Am J Med* 97:198-199.1994).
- Smelson DA, Roy A, Roy M, Tershakovec D, Engelhart C, Losonczy MF (Electroretinogram and cue-elicited craving in withdrawn cocaine-dependent patients: a replication. *Am J Drug Alcohol Abuse* 27:391-397.2001).
- Smelson DA, Roy M, Roy A, Santana S (Electroretinogram in withdrawn cocaine-dependent subjects. Relationship to cue-elicited craving. *Br J Psychiatry* 172:537-539.1998).
- Sofuoglu M, Kosten TR (Novel approaches to the treatment of cocaine addiction. *CNS Drugs* 19:13-25.2005).
- Sofuoglu M, Kosten TR (Emerging pharmacological strategies in the fight against cocaine addiction. *Expert Opin Emerg Drugs* 11:91-98.2006).
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5300-5305.2001).
- Spalton DJ, Marshall J (1995) La retina normal. In: *Atlas de Oftalmología Clínica* (Spalton, D. J. et al., eds), pp 13.12-19 Londres: Mosby
- Spanagel R, Zieglgänsberger W (Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* 18:54-59.1997).
- Srisurapanont M, Jarusuraisin N (Opioid antagonists for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev* 25:CD001867.2005).
- Steiss JE (2003) *Electrodiagnostic Evaluation In: Clinical Neurology in Small Animals - Localization, Diagnosis and Treatment*, vol. 2005 (K.G. Braund, ed) Ithaca NY: International Veterinary Information Service.
- Stenkamp DL, Frey RA, Mallory DE, Shupe EE (Embryonic retinal gene expression in sonic-you mutant zebrafish. *Dev Dyn* 225:344-350.2002).
- Strickland TL, Mena I, J V-M-, Tabbarah M, Millar B, Cummings J, Mehringer CM, Satz P, Myears H (Cerebral perfusion and neuropsychological consequences of chronic cocaine use. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 5:419-427.1993).
- Strömland K (Ocular abnormalities in the fetal alcohol syndrome. *Acta Ophthalmol Suppl* 171:1-50.1985).

- Strömmland K, Pinazo-Duran MD (Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol and Alcoholism* 37:2-8.2002).
- Svensk A-M, Soini Y, Pääkkö P, Hirvikoski P, Kinnula VL (Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 122:395-404.2004).
- Swift RM, Whelihan W, Kuznetsov O, Bongiorno G, Hsuing H (Naltrexone-induced alterations in human ethanol intoxication. *Am J Psychiatry* 151:1463-1467.1994).
- Telfer JF, Brock JH (Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 10:BR91-95.2004).
- Tenkova T, Young C, Dikranian K, Labruyere J, Olney JW (Ethanol-induced apoptosis in the developing visual system during synaptogenesis. *IOVS* 44:2809-2817.2003).
- Thompson M, Shuster L, Shaw K (Cocaine-induced hepatic necrosis in mice - the role of cocaine metabolism. *Biochem Pharmacol* 28:2389-2395.1979).
- Tiffany ST (Cognitive concepts of craving. *Alcohol Res Health* 23:215-224.1999).
- Tiihonen J, Halonen P, Wahlbeck K, Repo-Tiihonen E, Hyvärinen S, Eronen M, Putkonen H, Takala P, Mehtonen OP, Puck M, Oksanen J, Koskelainen P, Joffe G, Aer J, Hallikainen T, Rynänen OP, Tupala E (Topiramate add-on in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Psychiatry* 66:1012-1015.2005).
- Touyz RM (Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension. *Hypertension* 44:248-252.2004).
- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE (Activation of pharmacology agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:33-35.1982).
- Tseng KY, O'Donnell P (Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *J Neurosci* 24:5131-5139.2004).
- Tufan AC, Abban G, Akdogan I, Erdogan D, Ozogul C (The effect of in ovo ethanol exposure on retina and optic nerve in a chick embryo model system. *Reprod Toxicol* 23:75-82.2006).
- UNODC (2009) Informe Mundial Sobre las Drogas 2009. vol. http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2009/Executive_summary_Spanish.pdf: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C (Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 710:197-211.1982).
- Uys JD, LaLumiere RT (Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:482-491.2008).
- Van Vleet JF, Boon GD, Ferrans VJ (Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in weaning swine fed silver, cobalt, tellurium, zinc, cadmium, and vanadium. *Am J Vet Res* 42:789-799.1981).
- Verebey K, Mulé SJ (Naltrexone pharmacology, pharmacokinetics, and metabolism: current status. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2:357-363.1975).
- Victor M, Dreyfus P (Tobacco alcohol amblyopia. Further comments on its pathology. *Arch Ophthalmol* 74:649-657.1965).

- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* 13:337-345.1999).
- Volkow ND, Mullani N, Gould KL, Adler S, Krajewski K (Cerebral blood flow in chronic cocaine abuser: A study with positron emission tomography. *Br J Psychiatry* 151:641-648.1988).
- Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida O, O'Brien CP (Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 49:876-880.1992).
- Volpicelli JR, Rhines KC, Rhines JS, Volpicelli LA, Alterman AI, O'Brien CP (Naltrexone and alcohol dependence. Role of subject compliance. *Arch Gen Psychiatry* 54:737-742.1997).
- Wachtmeister L (Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG). III. Some omega amino acids and ethanol. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 59:609-619.1981).
- Walker BW, Koob GF (Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence. *Neuropsychopharmacology* 33:643-652.2008).
- Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR (Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann N Y Acad Sci* 937:1-26.2001a).
- Weiss F, Martin-Fardon R, Ciccocioppo R, Kerr TM, Smith DL, Ben-Shahar O (Enduring resistance to extinction of cocaine-seeking behavior induced by drug-related cues. *Neuropsychopharmacology* 25:361-372.2001b).
- Weiss F, Porrino LJ (Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J Neurosci* 22:3332-3337.2002).
- White HS (Molecular pharmacology of topiramate: managing seizures and preventing migraine. *Headache* 45:S48-S56.2005).
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH (Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res* 28:167-179.1997).
- White HS, Brown SD, Woodhead JH, Skeen GA, Wolf HH (Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia* 41:S17-S20.2000).
- Wiesbeck G, Dürsteler-MacFarland K (New developments in the pharmacotherapy of cocaine dependence. *Nervenarzt* 77:1066-1070.2006).
- Wilding J (Clinical evaluation of anti-obesity drugs. *Curr Drug Targets* 5:325-332.2004).
- Williams DE (Visual electrophysiology and psychophysics in chronic alcoholics and in patients on tuberculostatic chemotherapy. *Am J Optom Physiol Opt* 61:576-585.1984).
- Winkelman JW (Treatment of nocturnal eating syndrome and sleep-related eating disorder with topiramate. *Sleep Med* 2003:243-246.2003).
- Winyard PG, Morris CJ, Winrow VR, Ziaidi M, Blake D (1994) Free radical pathways in the inflammatory response. In: Free radical damage and its control (Rice-Evans, C. and Burdon, R., eds), pp 361-383 Amsterdam: Elsevier Science.
- Wise RA, Bozarth MA (A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492.1987).
- Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G (Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47:109-119.2004).

- Yanagida T, Tomita T (Local potassium concentration changes in the retina and the electroretinographic (ERG) b-wave. *Brain Res* 237:479-483.1982).
- Yang SS, Huang CC, Chen JR, Chiu CL, Shieh MJ, Lin SJ, Yang SC (Effects of ethanol on antioxidant capacity in isolated rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 11:7272-7276.2005).
- Yazajian B, Fain GL (Excitatory amino acid receptors on isolated retinal ganglion cells from the goldfish. *J Neurophysiol* 67:94-107.1992).
- Yeh HH, Kolb JE (Ethanol modulation of GABA-activated current responses in acutely dissociated retinal bipolar cells and ganglion cells. *Alcohol Clin Exp Res* 21:647-655.1997).
- Yoles E, Friedmann I, Barouch R, Shani Y, Schwartz M (Self-protective mechanism awakened by glutamate in retinal ganglion cells. *J Neurotrauma* 18:339-349.2001).
- Yoneda S, Tanaka E, Goto W, Ota T, Hara H (Topiramate reduces excitotoxic and ischemic injury in the rat retina. *Brain Res* 967:257-266.2003).
- Zalewska-Kaszubska J, Gorska D, Dyr W, Czarnecka E (Effect of acute administration of ethanol on beta-endorphin plasma level in ethanol preferring and non-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 85:155-159.2006).
- Zeng J, Borchman D, Paterson CA (Acute effect of ethanol on lens cation homeostasis. *Alcohol* 16:189-193.1998).
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL (Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.2002).
- Zubieta J-K, Dannals RF, Frost JJ (Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am J Psychiatr* 156:842-848.1999).
- Zullino DF, Cottier AC, Besson J (Topiramate in opiate withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:1221-1223.2002).
- Zullino DF, Khazaal Y, Hättenschwiler J, Borgeat F, Besson J (Anticonvulsant drugs in the treatment of substance withdrawal. *Drugs Today (Barc)* 40:603-619.2004).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores del peso inicial y final (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	82
Tabla 2. Alcoholemia en sangre (mmol/L) de las ratas durante el experimento.	82
Tabla 3. Valores del peso inicial y final (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	83
Tabla 4. Valores del tiempo implícito de la onda a del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	140
Tabla 5. Valores de la amplitud de la onda a del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	140
Tabla 6. Valores del tiempo implícito de la onda b del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	141
Tabla 7. Valores de la amplitud de la onda b del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	141
Tabla 8. Valores del tiempo implícito de la onda a del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	142
Tabla 9. Valores de la amplitud de la onda a del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	142
Tabla 10. Valores del tiempo implícito de la onda b del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.	143
Tabla 11. Valores de la amplitud de la onda b del ERG (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	143
Tabla 12. Valores del tiempo implícito de los PEV (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	144
Tabla 13. Valores de la amplitud de los PEV (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	144
Tabla 14. Valores del tiempo implícito de los PEV (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	145
Tabla 15. Valores de la amplitud de los PEV (media \pm desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	145
Tabla 16. Valores de la actividad glutatión peroxidasa (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.	146

Tabla 17. Valores de la concentración de GSH (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	146
Tabla 18. Valores de la concentración de MDA (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.....	147
Tabla 19. Valores de la concentración de MDA (media \pm desviación estándar) en ojo de los grupos control, etanol y etanol sin retirada.	147
Tabla 20. Valores de la actividad glutatión peroxidasa (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.	148
Tabla 21. Valores de la concentración de GSH (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	148
Tabla 22. Valores de la concentración de MDA (media \pm desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	149
Tabla 23. Valores de la concentración de glutamato (media \pm desviación estándar) en ojo de cuatro grupos del experimento con cocaína y topiramato.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las diferentes células que componen la retina y sus conexiones	11
Figura 2. Anatomía microscópica de la retina	12
Figura 3. Papel del epitelio pigmentario de la retina en la regeneración de los pigmentos visuales.	13
Figura 4. Representación esquemática de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por las células del epitelio pigmentario de la retina.	14
Figura 5. Representación esquemática de la ultraestructura de las células fotorreceptoras retinianas.....	16
Figura 6. Disposición de las células de Müller en el espesor de la retina.....	17
Figura 7. La célula de Müller	18
Figura 8. Esquemas de convergencia de las células fotorreceptoras en la retina	20
Figura 9. Esquema de la transmisión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares mediada por glutamato.	21
Figura 10. Registros de ERG obtenidos mediante distintas técnicas	31
Figura 11. Esquema de las rutas metabólicas del etanol.....	36
Figura 12. Rutas moleculares de sustancias adictivas.	55
Figura 13. Fórmula de la naltrexona.	55
Figura 14. Fórmula del topiramato.	58
Figura 15. Modelo experimental de alcohol.	66
Figura 16. Modelo experimental de cocaína.	68
Figura 17. Electrodo corneal tipo garaba.	70
Figura 18. Registro ERG en rata. Parámetros de medida.	71
Figura 19. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda a del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms)	84
Figura 20. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda a del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (μV).	84
Figura 21. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda b del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms).	85
Figura 22. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda b del ERG de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (μV)	85

Figura 23. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda a del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).....	86
Figura 24. Gráfico comparativo de la amplitud de la onda a del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV).....	87
Figura 25. Gráfico comparativo del tiempo implícito de la onda b del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).....	87
Figura 26. Gráfico comparativo la amplitud de la onda b del ERG de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV).....	88
Figura 27. Gráfico comparativo del tiempo implícito de los PEV de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en milisegundos (ms).....	89
Figura 28. Gráfico comparativo de la amplitud de los PEV de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en microvoltios (μV).....	89
Figura 29. Gráfico comparativo del tiempo implícito de los PEV de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en milisegundos (ms).....	90
Figura 30. Gráfico comparativo de la amplitud de los PEV de los grupos control, control-topiramato, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en microvoltios (μV).....	91
Figura 31. Gráfico comparativo de la actividad glutatión peroxidasa en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y, etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramos de proteína por minuto (nmol/mg proteína*min).....	92
Figura 32. Gráfico comparativo de la concentración de GSH en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.....	92
Figura 33. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, control-naltrexona, etanol y etanol-naltrexona, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.....	93
Figura 34. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, etanol y etanol sin retirada, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.....	94

Figura 35. Gráfico comparativo de la actividad glutatión peroxidasa en ojo de los grupos control, control-topiramado, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramos de proteína por minuto (nmol/mg proteína*min).....	95
Figura 36. Gráfico comparativo de la concentración de GSH en ojo de los grupos control, control-topiramado, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.....	96
Figura 37. Gráfico comparativo de la concentración de MDA en ojo de los grupos control, control-topiramado, cocaína, cocaína-topiramato, retirada y retirada-topiramato, expresado en nanomoles por miligramo de proteína.....	97
Figura 38. Gráfico comparativo de la concentración de glutamato en ojo de los grupos control, control-topiramado, cocaína y cocaína-topiramato, expresado en nM	97
Figura 39. Correlación entre la actividad GSH-Px (nmol/mg proteína*min) y los niveles de glutamato (nM) en ojo del experimento con cocaína y topiramato.....	98

ANEXO

Tablas de los datos representados en los histogramas

	Tiempo implícito de la onda a (ms)
Control	22.9 ± 1.4
Control-Naltrexona	23.0 ± 0.6
Etanol	25.6 ± 2.4*
Etanol-Naltrexona	22.8 ± 1.9

Tabla 4. Valores del tiempo implícito de la onda a del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona. * $p < 0.05$ vs. todos los grupos.

	Amplitud de la onda a (μV)
Control	45.9 ± 12.5
Control-Naltrexona	49.1 ± 10.2
Etanol	50.9 ± 29.1
Etanol-Naltrexona	37,8 ± 15.7

Tabla 5. Valores de la amplitud de la onda a del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

	Tiempo implícito de la onda b (ms)
Control	53.9 ± 7.5
Control-Naltrexona	52.3 ± 4.9
Etanol	52.0 ± 4.2
Etanol-Naltrexona	55.7 ± 3.5

Tabla 6. Valores del tiempo implícito de la onda b del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

	Amplitud de la onda b (µV)
Control	150.2 ± 18.1
Control-Naltrexona	166.7 ± 13.0
Etanol	118.1 ± 29.0*
Etanol-Naltrexona	117.2 ± 24.3*

Tabla 7. Valores de la amplitud de la onda b del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona. * $p < 0.05$ vs. control y control-naltrexona.

	Tiempo implícito de la onda a (ms)
Control	23.5 ± 0.0
Control-Topiramato	24.4 ± 2.9
Cocaína	20.5 ± 4.2
Cocaína-Topiramato	22.0 ± 5.7
Retirada	25.6 ± 3.1
Retirada-Topiramato	25.2 ± 0.3

Tabla 8. Valores del tiempo implícito de la onda a del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Amplitud de la onda a (µV)
Control	40.6 ± 9.1
Control-Topiramato	64.4 ± 29.5
Cocaína	10.3 ± 6.1*
Cocaína-Topiramato	30.1 ± 9.3**
Retirada	56.1 ± 14.3
Retirada-Topiramato	57.5 ± 7.1

Tabla 9. Valores de la amplitud de la onda a del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato. * $p < 0.05$ vs. todos los grupos; ** $p < 0.05$ vs. retirada-topiramato.

	Tiempo implícito de la onda b (ms)
Control	52.7± 3.3
Control-Topiramato	54.5 ± 4.5
Cocaína	56.8 ± 6.6
Cocaína-Topiramato	56.0 ± 5.5
Retirada	57.6 ± 6.1
Retirada-Topiramato	52.0 ± 6.3

Tabla 10. Valores del tiempo implícito de la onda b del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Amplitud de la onda b (µV)
Control	179.0 ± 64.7
Control-Topiramato	219.1 ± 76.2
Cocaína	124.6 ± 60.3
Cocaína-Topiramato	141.1 ± 35.1
Retirada	173.8 ± 73.5
Retirada-Topiramato	175.4 ± 26.8

Tabla 11. Valores de la amplitud de la onda b del ERG (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Tiempo implícito de los PEV (ms)
Control	35.9 ± 2.4
Control-Naltrexona	37.8 ± 1.5
Etanol	38.9 ± 3.2*
Etanol-Naltrexona	39.8 ± 1.5*

Tabla 12. Valores del tiempo implícito de los PEV (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona. * $p < 0.05$ vs. control.

	Amplitud de los PEV (μV)
Control	71.8 ± 30.4
Control-Naltrexona	43.3 ± 3.4*
Etanol	32.8 ± 12.0*
Etanol-Naltrexona	56.1 ± 24.1

Tabla 13. Valores de la amplitud de los PEV (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona. * $p < 0.05$ vs. control.

	Tiempo implícito de los PEV (ms)
Control	36.0 ± 0.8
Control-Topiramato	38.8 ± 4.4
Cocaína	35.8 ± 10.7
Cocaína-Topiramato	40.8 ± 1.7
Retirada	37.3 ± 2.6
Retirada-Topiramato	38.5 ± 5.7

Tabla 14. Valores del tiempo implícito de los PEV (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Amplitud de los PEV (μV)
Control	93.9 ± 60.5
Control-Topiramato	59.4 ± 22.4
Cocaína	37.4 ± 13.4
Cocaína-Topiramato	103.6 ± 77.7
Retirada	50.7 ± 18.2
Retirada-Topiramato	82.2 ± 36.3

Tabla 15. Valores de la amplitud de los PEV (media ± desviación estándar) de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Actividad GSH-Px (nmol/mg proteína*min)
Control	20.8 ± 9.2
Control-Naltrexona	24.0 ± 7.0
Etanol	20.3 ± 4.2
Etanol-Naltrexona	21.2 ± 2.7

Tabla 16. Valores de la actividad glutatión peroxidasa (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

	Concentración GSH (nmol/mg proteína)
Control	6.7 ± 2.7
Control-Naltrexona	6.0 ± 2.3
Etanol	6.8 ± 1.5
Etanol-Naltrexona	6.5 ± 1.9

Tabla 17. Valores de la concentración de GSH (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

	Concentración MDA (nmol/mg proteína)
Control	0.70 ± 0.40
Control-Naltrexona	0.89 ± 0.23
Etanol	0.70 ± 0.34
Etanol-Naltrexona	0.72 ± 0.29

Tabla 18. Valores de la concentración de MDA (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con etanol y naltrexona.

	Concentración MDA (nmol/mg proteína)
Control	0.70 ± 0.40
Etanol	0.70 ± 0.34
Etanol sin retirada	1.60 ± 0.30*

Tabla 19. Valores de la concentración de MDA (media ± desviación estándar) en ojo de los grupos control, etanol y etanol sin retirada. * $p < 0.05$ vs. control y etanol.

	Actividad GSH-Px (nmol/mg proteína*min)
Control	39.6 ± 9.3
Control-Topiramato	40.6 ± 12.1
Cocaína	41.4 ± 16.0
Cocaína-Topiramato	28.2 ± 7.1
Retirada	34.1 ± 8.6
Retirada-Topiramato	34.0 ± 7.5

Tabla 20. Valores de la actividad glutatión peroxidasa (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Concentración GSH (nmol/mg proteína)
Control	3.8 ± 1.1
Control-Topiramato	6.9 ± 2.1
Cocaína	6.2 ± 2.6
Cocaína-Topiramato	6.6 ± 4.3
Retirada	6.6 ± 4.0
Retirada-Topiramato	8.4 ± 5.1

Tabla 21. Valores de la concentración de GSH (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato.

	Concentración MDA (nmol/mg proteína)
Control	3.2 ± 1.1
Control-Topiramato	1.8 ± 0.9*
Cocaína	2.0 ± 1.4
Cocaína-Topiramato	1.4 ± 1.0*
Retirada	2.2 ± 0.9
Retirada-Topiramato	1.8 ± 1.5*

Tabla 22. Valores de la concentración de MDA (media ± desviación estándar) en ojo de los diferentes grupos del experimento con cocaína y topiramato. * $p < 0.05$ vs. control.

	Concentración glutamato (nM)
Control	23.9 ± 6.9
Control-Topiramato	24.1 ± 17.4
Cocaína	47.3 ± 14.6*
Cocaína-Topiramato	17.9 ± 9.0

Tabla 23. Valores de la concentración de glutamato (media ± desviación estándar) en ojo de cuatro grupos del experimento con cocaína y topiramato. * $p < 0.05$ vs. todos los grupos.