



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**CAMBIOS CEREBRALES Y CEREBELOSOS MACRO Y MICROSCÓPICOS
RELACIONADOS AL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL EN UN MODELO
DE RATA WISTAR**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN PABLO MAYA ARTEAGA

TUTOR:

DR. EDUARDO ADRIAN GARZA VILLARREAL
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DR. ROMÁN VIDAL TAMAYO
UNIVERSIDAD DE MONTERREY, UDEM

JURIQUILLA, QUEÉTARO, DICIEMBRE DEL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio B-03, "Laboratorio de Neuropsiquiatría Computacional y Translacional", en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. El proyecto estuvo bajo la dirección del Dr. Eduardo Garza Villarreal y contó con el respaldo de los proyectos de UNAM-PAPIIT: IA202120 e IA201622.

Este proyecto fue avalado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla, México con el número de proyecto 113.A. Todos los procedimientos y el estudio se realizaron de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de la Secretaría de Salud que sigue la Mexicana Norma Oficial, 1999. Además, se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de el Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996) y the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council.

El sustentante formó parte del programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue beneficiario de una beca otorgada por el CONACyT con el número 1146345.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del comité Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Juan Pablo Maya Arteaga, cuyo título es “**Cambios Cerebrales y Cerebelosos Macro y Microscópicos relacionados al consumo crónico de alcohol en un modelo de rata Wistar**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dr. Luis Concha Loyola

Secretario:

Dr. Eduardo Adrián Gaarza Villarreal

Vocal:

Dra. Nayeli Páez Martínez

Suplente:

Dr. Daniel Reyes Haro

Suplente:

Dra. Wendy Portillo Martínez

Agradecimientos

A mis padres, Juan Manuel Maya Pastrana y Raquel Arteaga Lugo, por haberme brindado una sólida base de trabajo y valores.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Posgrado en Ciencias (Neurobiología).

A mi tutor, el Dr. Eduardo Garza, por abrirme las puertas a este campo, su mentoría y confianza a lo largo de estos tres años; llevaré conmigo sus enseñanzas.

A las integrantes del laboratorio B-03: Luis, Cesar, Alethia, Diego A, Alejandra, Jalil, Diego O, David, Mariana y Débora, por haberme compartido generosamente su tiempo, conocimiento y esfuerzo, han enriquecido enormemente mi experiencia.

A los miembros del jurado revisor de tesis, el Dr. Reyes Haro, el Dr. Concha Loyola y la Dra. Páez Martínez, por el valioso tiempo que generosamente dedicaron a la revisión de la tesis, así como por los enriquecedores comentarios que brindaron. Valoro su contribución para impulsar mi desarrollo académico.

A los miembros del Comité Tutor, el Dr. Román Vidal Tamayo y la Dra. Wendy Portillo Martínez, por sus valiosas aportaciones y perspicaces preguntas que han contribuido a mi investigación y formación.

A la Dra. Alejandra Sierra y mis compañeros de Kuopio: Raimo Salo, Omar Narváez, Melina Estela, Jenni Kyyriäinen, Angela Naranjo, Sara Gröhn, Juan Miguel Valverde, Maxime Yon, Juha Valjakka, Lenka Dvoráková, Ekaterina Zhurakovskaya y Mastaneh Torkamani. Su generosidad al compartir su conocimiento y tiempo ha ampliado significativamente mi perspectiva tanto en el ámbito académico como en el personal.

Al Dr. Juan Riesgo, al Dr. Saraél Alcauter, la Dra. Mónica López y al Dr Olli Gröhn, por compartirme su visión de la ciencia.

A mis amigos de maestría, Jesús Andrade, Juliaza Loza, César Cano, Sara Chavez y Oswaldo Sánchez, por su compañía a lo largo de este camino, no hubiera sido igual sin ustedes.

A mis amigos, Pedro Burgos, Víctor Lagunas, Aaron Cohen, Francisco Gonzaga, Daniel Astorga y Daniel Granados, por siempre estar.

A las responsables de las Unidades de Apoyo del Instituto de Neurobiología: Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), el Dr. Juan José Ortiz Retana de la Unidad de Resonancia Magnética, el MVZ Martín García y la Dra. Alejandra Castilla del Laboratorio Universitario de Bioterio, la Dra. Nuri Aranda López de la Unidad de Enseñanza, y a la Ing. Ma. Lourdes Palma Tirado, la Dra. Ericka A. de los Ríos y la Dra. Elsa Nydia Hernández de la Unidad de Histología y Microscopía, por haberme brindado su apoyo, haberme ayudado a crecer y haberme compartido sus valiosas enseñanzas, han sido fundamental en mi formación personal y académica.

“Sapere aude!”
Was ist Aufklärung?, I. Kant

Indice de Contenido

	Resumen	14
	Abstract	15
Capítulo I:	Introducción	16
	Justificación	17
Capítulo II:	Marco Teórico	18
	II.1) Trastorno por uso de Sustancias (SUD)	18
	II.2) Trastorno por uso de Alcohol (AUD)	21
	II.3) Modelos de Alcohol	21
	II.4) Células del Tejido Nervioso: Glía	23
	II.5) Relación Neuronas-Astroцитos-microglía	25
	II.6) Plasticidad sináptica: Neuronas, Astroцитos y Microglía	26
	II.7) Neuroinflamación, Gliopatía y Plasticidad Maladaptativa	27
	II.8) Neuronas, Astroцитos y microglía en el Trastorno por consumo de Alcohol	28
	II.9) Resonancia Magnética en el Trastorno por consumo de Alcohol	28
	II.10) Hallazgos celulares en el AUD	31
	II.11) Correlación de cambios celulares con los cambios volumétricos	32
Capítulo III:	Materiales, Métodos y Análisis de Datos	35
	III.1) Modelo Experimental	35
	III.2) Imágenes Digitales como herramientas de estudio	36
	III.3) Adquisición de las imágenes de Resonancia Magnética y Microscopía	37
	III.4) Adquisición de las imágenes por resonancia Magnética	38
	III.5) Seccionamiento e Inmunofluorescencia	40
	III.6) Adquisición de las imágenes de Microscopía	41
	III.7) Preprocesamiento de las imágenes de Resonancia Magnética	41
	III.8) Morfometría Basada en Deformación	42

	III.9) Análisis de las imágenes de Microscopía	42
	III.10) Regresión Lineal	43
Capítulo IV:	Resultados	44
	IV.1) Resultados del Análisis de Morfometría Basada en Deformación	44
	IV.2) Resultados de la exploración del correlato histológico de las alteraciones en los volúmenes locales obtenidos a través del análisis de DBM.	45
	IV.3) Cambios macroscópicos en PCM, Crus I y Lóbulo X	46
	IV.4) Resultados de la comparación histológica en PCM, Crus-I y LobX	48
	IV.5) Conteo Celular en PCM, Crus-I y LobX	51
	IV.6) Regresión Lineal Múltiple entre cambios Macroscópicos y Microscópicos	53
Capitulo V:	Discusión y Conclusiones	55
	V.1) Morfometría Basada en Deformación	55
	V.2) Correlato Histológico	56
	V.3) Conteo Celular	59
	V.4) Regresión Lineal Múltiple	60
Capitulo VI:	Perspectiva	63
Capitulo VII:	Anexos	66
	Anexo I: Morfometría Basada en Deformación	66
	Anexo II: Regresión Lineal	67
	Anexo III: Protocolo Inmunofluorescencia	68
	Anexo IV: Experimento de automatización del conteo celular	69
	Anexo V: Estudio Histológico Avanzado y Análisis de Morfología	75
	Anexo VI: Estudio de Imágenes de Resonancia Magnética Ponderadas por Difusión	77
	Anexo VII: Estudio de Órganos Periféricos y su Impacto en la Patogenia	80
	Referencias	90

Índice de Figuras

Figura 1:	Modelo IA2B.	36
Figura 2:	Diseño experimental.	38
Figura 3:	Análisis de morfometría basado en deformación (DBM).	40
Figura 4:	Seccionamiento e Inmunofluorescencia.	41
Figura 5:	Preprocesamiento de Imágenes de Resonancia Magnética.	42
Figura 6:	Procesamiento de imágenes de Microscopía para conteo automatizado.	43
Figura 7:	Mapa paramétrico del valor t.	44
Figura 8:	Hallazgos histológicos de 7 ROIs identificadas por el análisis de DBM.	46
Figura 9:	Distribución de los volúmenes de las ROI seleccionadas en la muestra para el estudio histológico.	47
Figura 10:	Comparación histológica del Pedúnculo Cerebeloso Medio (PCM) entre los grupos control (Ctr) y expuestos a alcohol (EtOH).	48
Figura 11:	Comparación histológica en Crus-I del Cerebelo entre los grupos control (Ctr) y expuestos a alcohol (EtOH).	49
Figura 12:	Comparación histológica del Lóbulo X del Cerebelo entre grupos de ratas control y experimentales.	49
Figura 13:	Representación gráfica del conteo celular en el Pedúnculo Cerebeloso Medio (Izquierdo).	50
Figura 14:	Representación gráfica del conteo celular en Crus-I (Izquierdo).	51
Figura 15:	Representación gráfica del conteo celular en el Lóbulo X del Cerebelo.	51
Figura 16:	Análisis de Regresión Lineal en Pedúnculo Cerebeloso Medio.	52
Figura 17:	Análisis de Regresión Lineal en Crus-I del Cerebelo.	53

Figura 18:	Análisis de Regresión Lineal en Lobulo X del Cerebelo.	53
Figura 19:	Comparación entre dos sujetos expuestos a alcohol en Pedúnculo Cerebeloso Medio.	56
Figura 20:	Comparación del volumen detectado por morfometría y los hallazgos de microscopía.	57
Figura 21:	Análisis Morfológico.	62
Figura 22:	Análisis basado en regiones de interés y distribución de la kurtosis media en las regiones de interés.	63
Figura 23:	Hallazgos Histológicos en Hígado y Bazo de Ratas con Consumo Crónico de Alcohol, evaluados mediante H&E y Tricrómico de Masson.	64
Figura 24:	Esquema de las diferentes modalidades de adquisición para la captura de imágenes de microscopía.	71
Figura 25:	Ejemplo de Diferentes Modalidades de Adquisición de Imágenes.	72
Figura 26:	Métodos de <i>thershold</i> y tipos de conteo.	73
Figura 27:	Imágenes de Órganos Disecados - Hígado y Bazo.	84
Figura 28:	Tinción de Hematoxilina y Eosina en el Hígado del Grupo Experimental.	86
Figura 29:	Tinción de Tricrómico de Masson en el Hígado del Grupo Experimental.	87
Figura 30:	Tinción de Hematoxilina y Eosina en el Bazo.	87
Figura 31:	Tinción de Tricrómico de Masson en el Bazo del Grupo Experimental.	88

Indice de Tablas

Tabla 1:	Áreas afectadas en el ciclo de la adicción.	20
Tabla 2:	Comparación de diferentes estudios empleando el IA2BC	23
Tabla 3:	Resultados de estudios científicos sobre investigaciones en consumo de alcohol utilizando Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)	30
Tabla 4:	Resultados del análisis de Morfometría basada en Deformación.	45
Tabla 5:	Comparación entre modelos de alcohol.	54
Tabla 6:	Diluciones Estandarizadas de Anticuerpos.	69
Tabla 7:	Resultados de los diferentes métodos de conteo automatizado	73
Tabla 8:	Resultados del método de automatización.	74

Lista de Abreviaturas

ACC	Corteza del cíngulo anterior
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
ANLS	lanzadera de lactato astrocito-neurona
AUD	trastorno por consumo de alcohol (Alcohol Use Disorder)
BAC	concentración de alcohol en sangre
BDMA	Modelo de la adicción como una enfermedad cerebral (Brain Disease Model of Addiction)
BNST	núcleo basal de la estría terminal
BSA	suero de albúmina bovina
CPu	Caudado Putamen
CRF	Factor liberador de Corticotropina
Ctrl	Control
DBM	morfometría basada en deformación
dIPFC	Corteza Prefrontal dorsolateral
DS	estriado dorsal
ENCODAT	Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco
EtOH	Etanol
FA	fracción de anisotropía
FDR	tasa de falsos descubrimientos
FOV	campo de visión
GFAP	proteína fibrilar ácida glial
GM	sustancia gris
GP	Globo Pálido
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
HPC	Hipocampo
IA2BC	consumo intermitente de alcohol a 2 botellas
Iba-1	molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1
IM	Imágenes de Microscopía
INB	Instituto de Neurobiología
Ins	Insula
IRM	Imágenes de Resonancia Magnética
LANIREM	Laboratorio Nacional de imagenología por Resonancia Magnética
Lob	Lóbulo

MD	difusividad promedio
NAc	Núcleo Accumbens
OFC	Corteza Orbitofrontal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCM	Pedúnculo Cerebeloso Medio
ROI	regiones de interés
ROS	especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
SPM	mapas estadísticos paramétricos
SUD	trastorno por consumo de sustancias (sustance use disorder)
TE	Tiempo de Echo
TR	Tiempo de Repetición
UNAM	Universidad Autónoma de México
vmPFC	Corteza Prefrontal ventromedial
VTA	Área Tegmental Ventral
WM	sustancia blanca

Resumen

El consumo de alcohol es una práctica extendida y aceptada a nivel global. Sin embargo, aún existe una falta de comprensión en relación a las consecuencias a largo plazo y al desarrollo del trastorno por consumo de alcohol. A pesar de que se han realizado investigaciones sobre los efectos del alcohol en seres humanos mediante la resonancia magnética, la evidencia de las asociaciones entre el consumo de alcohol y los cambios estructurales relacionados es limitada. Esto se podría deber a la gran heterogeneidad de la población estudiada. Por este motivo, en este estudio, hemos utilizado un modelo de consumo voluntario crónico de alcohol (IA2BC) en ratas Wistar para analizar las diferencias en volumen detectables a través de la resonancia magnética (n=90: 20 Ctr; 70 EtOH) mediante un análisis de morfometría basada en deformación. Posteriormente, hemos examinado las alteraciones en las poblaciones neuronales, microgliales y astrocitarias a través de inmunofluorescencia para determinar si estos cambios explican las alteraciones en las estructuras cerebrales a mayor escala.

Nuestros resultados revelaron una disminución en el volumen de las áreas subcorticales, como el bulbo olfatorio, el estriado ventral, el estriado dorsal y el pedúnculo cerebeloso, acompañada de un aumento en regiones corticales como el retrosplenial y en regiones cerebelosas, específicamente en Crus-I y Lóbulo IX y X. Una vez identificadas las regiones que presentan cambios locales en el volumen mediante el análisis de morfometría basada en deformación, seleccionamos tres regiones de interés: el Pedúnculo Cerebeloso Medio (Vol_{Ctrl}:0.1825, Vol_{EtOH}: 0.1018), Crus-I (Vol_{Ctrl}:-0.1546, Vol_{EtOH}: 0.0712838), y Lóbulo X del Cerebelo (Vol_{Ctrl}: 0.1218, Vol_{EtOH}: 0.1771) para llevar a cabo un estudio histológico más detallado (n=11; 5 Ctr; 6 EtOH). Utilizando inmunofluorescencia con marcadores NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos) e Iba-1 (microglía), evaluamos las diferencias en el conteo celular. En la región del Pedúnculo Cerebeloso Medio, encontramos que las células marcadas con Iba-1 incrementaron un 148.78% su valor (Ctr: 162.35; EtOH: 404.58), mientras que en las regiones de Crus-I y Lóbulo X, dicho valor se incrementó 529.06% (Ctr: 165-187; EtOH: 1,000-1037).

Finalmente, aplicamos un análisis de regresión lineal múltiple para investigar en qué medida las alteraciones en los volúmenes pueden ser explicadas por cambios en el conteo celular. Observamos un aumento en la población de microglía y astrocitos en las regiones de interés en las ratas expuestas al alcohol, con diferentes patrones de distribución dependiendo de si el volumen aumentaba (dispersión; gliosis) o disminuía (concentración; cicatriz glial) en comparación con los sujetos control. En la región del Pedúnculo Cerebeloso Medio obtuvimos una R^2 ajustada de 0.96 y un valor p en conjunto de 0.13. En la región de Crus-I del cerebelo se obtuvo una R^2 ajustada de 0.99 y un valor p en conjunto menor a 0.01. En la región del Lóbulo X del cerebelo se obtuvo una R^2 ajustada de 0.28 y un valor p en conjunto de 0.71.

Abstract

Alcohol consumption is a widespread and globally accepted practice. However, there remains a lack of understanding regarding its long-term consequences and the development of alcohol use disorder. Despite research on the effects of alcohol in humans using magnetic resonance imaging, evidence linking alcohol consumption to related structural changes is limited. Therefore, in this study, we employed a model of chronic voluntary alcohol consumption (IA2BC) in Wistar rats to analyze detectable volume differences via magnetic resonance imaging (n=90: 20 Ctr; 70 EtOH) using deformation-based morphometry. Subsequently, we examined alterations in neuronal, microglial, and astrocytic populations through immunofluorescence to determine if these changes account for structural alterations at a larger scale.

Our findings revealed a reduction in the volume of subcortical areas, such as the olfactory bulb, ventral and dorsal striatum, and the cerebellar peduncle, accompanied by an increase in cortical regions, particularly in the retrosplenial cortex, and cerebellar regions, specifically in Crus-I and Lobules IX and X. After identifying the regions with localized volume changes through deformation-based morphometry, we selected three regions of interest: the Middle Cerebellar Peduncle (VolCtr: 0.1825, VolEtOH: 0.1418), Crus-I (VolCtr: -0.1346, VolEtOH: -0.0712838), and Cerebellar Lobe X (VolCtr: 0.0818, VolEtOH: 0.0671) to conduct a more detailed histological study (n=11; 5 Ctr; 6 EtOH). Using immunofluorescence with NeuN (neurons), GFAP (astrocytes), and Iba-1 (microglia) markers, we assessed differences in cell counts. In the Middle Cerebellar Peduncle region, we found that cells labeled with Iba-1 increased up to 148.78% (Ctr: 162.35; EtOH: 404.58), while in the Crus-I and Lobe X regions, this value increased up to 529.06% (Ctr: 165-187; EtOH: 1,000-1037).

Finally, we applied a multiple linear regression analysis to investigate the extent to which volume changes can be explained by changes in cell counts. We observed an increase in microglial and astrocytic populations in the regions of interest in rats exposed to alcohol, with different distribution patterns depending on whether the volume increased (dispersion; gliosis) or decreased (concentration; glial scar) compared to control subjects. In the Middle Cerebellar Peduncle region, we obtained an adjusted R^2 of 0.96 and an overall p-value of 0.13. In the Crus-I region of the cerebellum, we achieved an adjusted R^2 of 0.99 and an overall p-value less than 0.01. In the Cerebellar Lobe X region, we obtained an adjusted R^2 of 0.28 and an overall p-value of 0.71.

Capítulo I

Introducción

A nivel mundial, en el año 2019, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó más de 180 mil muertes debido al consumo directo de drogas ilícitas. Paralelamente, el consumo excesivo de alcohol contribuyó a aproximadamente 3 millones de decesos anuales. En el contexto de México, la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) destaca una preocupante tendencia: un significativo aumento en el consumo de alcohol entre la población general durante el período del 2002 al 2011. Esta tendencia se refleja en el incremento de la prevalencia de personas que han consumido alcohol en algún momento de sus vidas (de 64.9% a 71.3%), en el último año (de 46.3% a 51.4%), y en el último mes (de 19.2% a 31.6%). Además, se observa un aumento en el número de personas dependientes de esta sustancia (de 4.1% a 6.2%). Los resultados de la encuesta correspondiente al periodo 2016-2017 revelan una creciente inclinación hacia el consumo diario (de 0.8% a 2.9%) y el consumo habitual (de 12.3% a 19.8%) en la población general de edades comprendidas entre los 12 y 65 años. Sin embargo, es preocupante que únicamente un pequeño porcentaje de los casos de dependencia (14.9% en hombres y 8.1% en mujeres) busque tratamiento. Estos hallazgos indican claramente que en México, el consumo de alcohol, especialmente en forma de patrón excesivo, está en aumento. La amplia aceptación social, e incluso promoción dentro del núcleo familiar, facilita su consumo en nuestra población, lo que resulta en una percepción de riesgo reducida y, por ende, un aumento en su consumo y la consecuente dependencia.

Este panorama resalta la urgente necesidad de fomentar una cultura de prevención que evite tanto el aumento en la cantidad de consumo como en el número de consumidores. Para lograr una disminución en esta prevalencia, es esencial unir esfuerzos entre la comunidad científica y el gobierno. Por un lado, el gobierno podría llevar a cabo diversas acciones, incluyendo: a) el aumento de los servicios de salud pública orientados a la atención de problemas de adicción y salud mental, garantizando su acceso a la población; b) el desarrollo de políticas de prevención que retrasen el inicio del consumo y eviten el consumo excesivo; y c) la implementación de medidas para fomentar la adhesión de los pacientes a los programas de tratamiento ya existentes. Por otra parte, la ciencia tiene importantes roles que desempeñar, tales como: i) elucidar los mecanismos neurobiológicos que conducen de un consumo ocasional a la adicción; ii) identificar biomarcadores que permitan una detección temprana del problema y, por ende, prevengan la transición a la dependencia; y iii) desarrollar tratamientos efectivos para aquellos individuos que ya sufren del trastorno por consumo de sustancias.

Esta problemática ha preocupado a los científicos desde el siglo pasado. Leshner (1997) afirmaba que la adicción es un problema de salud pública que afecta la integridad física, social, familiar y mental de quienes la padecen. Lemere (1956) sostenía que, por cada alcohólico con una patología demostrable, había miles con daños intermedios. Brewer (1971) argumentaba que era razonable suponer que si una persona con un cerebro intacto no podía controlar su consumo, entonces alguien con un cerebro dañado sería aún menos capaz de hacerlo.

En la actualidad, Volkow y Koob (2005) han desarrollado un modelo de adicción como una enfermedad cerebral, conocido como el "Brain Disease Model of Addiction". Este enfoque postula que cada manifestación psicológica es una expresión de un cambio físico. Este planteamiento ha ganado fuerza gracias a los resultados de estudios clínicos y preclínicos, demostrando la existencia de cambios neuroplásticos tanto estructurales como funcionales a nivel de sinapsis y circuitos neuronales, inducidos por la exposición a drogas.

Justificación

La presente tesis encuentra su justificación en respuesta al creciente impacto del consumo de alcohol en la salud pública a nivel mundial y nacional. En el contexto específico de México, los datos de la ENCODAT resaltan una tendencia alarmante al aumento del consumo de alcohol en la población general. Este incremento en el consumo excesivo de alcohol, agravado por su aceptación social e incluso dentro del ámbito familiar, pone de manifiesto la urgente necesidad de adoptar enfoques preventivos para mitigar los riesgos asociados.

Los estudios científicos han resaltado la importancia de entender cómo las drogas inducen la dependencia y generan efectos adversos en la salud, trastocando los paradigmas sociales y estableciendo el trastorno por uso de sustancias como una enfermedad con un sólido fundamento neurobiológico. Este cambio de perspectiva permite abordar al trastorno por consumo de alcohol como una enfermedad, lo que resalta un fundamento neurobiológico y permite mirar hacia una posible terapéutica.

Esta investigación se fundamenta en la necesidad apremiante de lograr una comprensión más profunda de los mecanismos neurobiológicos subyacentes al trastorno por consumo de alcohol. Si bien, se han realizado estudios sobre el tema, la gran heterogeneidad de la muestra estudiada no ha permitido evidencia sólida sobre los efectos del alcohol en el sistema nervioso. Frente a esta problemática, los modelos animales han representado una ventaja al poder controlar diversas variables, permitiendo estudiar los efectos depurados del alcohol.

Esta investigación persigue el avance en la comprensión de las alteraciones estructurales resultantes del consumo crónico de alcohol mediante la integración de técnicas de resonancia magnética e inmunofluorescencia. Se analiza la interrelación entre cambios macro y microestructurales, con el objetivo de asociar los cambios volumétricos con las alteraciones en las principales células nerviosas: neuronas, astrocitos y microglía. Estos hallazgos podrían proporcionar información valiosa acerca de los componentes específicos del sistema nervioso afectados por el consumo crónico de alcohol, contribuyendo así a una comprensión más profunda de la patogenia y la recurrencia del trastorno. La relevancia de esta investigación radica en su potencial para establecer una base científica sólida que permita abordar de manera más eficaz un problema de salud pública cada vez más urgente en la sociedad contemporánea.

Capítulo II

Marco Teórico

II.1) Trastorno por uso de Sustancias (SUD)

Se denomina “droga” a toda sustancia química que modifica los procesos fisiológicos y bioquímicos de los tejidos o los organismos (3). Este término se usa tanto para sustancias con fines médicos como para sustancias psicoactivas, también llamadas “drogas de abuso” (3, 14). El concepto de droga está estrechamente relacionado al de adicción. La palabra “adicto” viene del vocablo latino “*addictus*” (entregado a alguien, esclavo), sustantivo que se empleaba para referirse al tipo específico de personas que se convertían en esclavos debido a las grandes cantidades de deudas que tenían con otra persona (1, 2). Semánticamente, estas palabras se relacionan con el hecho de que el adicto prioriza el consumo de la droga sobre el resto de sus actividades (3). Por lo que, históricamente, la adicción se ha relacionado con la dependencia del sujeto (adicto) a una sustancia (droga de abuso; 1, 2). Esta dependencia se dividía en física y psicológica según sus manifestaciones clínicas (1). Sin embargo, en la actualidad, la evidencia señala que toda manifestación psicológica es expresión de un cambio físico (1). Debido a esto, se han aunado esfuerzos para cambiar el estigma de la adicción vista como “un trastorno moral”, a una fundamentado en sus bases neurobiológicas como una patología cerebral (8, 10, 11). Dicho abordaje se conoce como *Brain Disease Model of Addiction* (BDMA). Este planteamiento ha ganado fuerza debido a resultados de estudios clínicos y preclínicos en los cuales se ha comprobado la existencia de cambios neuroplásticos estructurales y funcionales a nivel de sinapsis y circuitos neuronales provocados por la exposición repetida a drogas (6, 10). Así pues, se define al trastorno por uso de sustancias (SUD, por sus siglas en inglés: *Substance Use Disorder*) como una enfermedad neurológica crónica recidivante caracterizada por **1**) la compulsión de búsqueda y consumo de la droga, **2**) la pérdida en el control de su consumo y **3**) el surgimiento de estados emocionales negativos (ej. disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando se interrumpe el consumo de dicha droga, descritos clásicamente como “síndrome de abstinencia” (3, 4, 5). El mecanismo *grosso modo* mediante el cual una droga pasa de un consumo controlado a uno abusivo se puede describir como un ciclo de 3 fases recurrentes y como un condicionamiento clásico Pavloviano (8, 12, 27):

- **Intoxicación:**

Estado posterior a la administración de una sustancia psicoactiva, que causa alteraciones en el nivel de conciencia, cognición, percepción, juicio, afectividad y en comportamiento, así como en otras funciones y respuestas psicofisiológicas. Estas alteraciones están relacionadas con los efectos farmacológicos agudos de la sustancia (3). La fase de intoxicación es explicada desde el punto de vista filogenético por el sistema de recompensa, así como desde un abordaje pavloviano por las saliencias incentivas:

- **Sistema de Recompensa**

Las drogas de abuso activan circuitos de recompensa (sistema mesocorticolímbico dopaminérgico: área tegmental ventral, estriado ventral [núcleo accumbens, tubérculo olfatorio], estriado dorsal [núcleo caudado y putamen], sustancia negra [pars compacta y pars reticulata], corteza prefrontal, corteza cingulada anterior, corteza insular, hipocampo, hipotálamo [núcleos orexigénicos y laterales], tálamo,

subtálamo, globo pálido, pálido ventral, amígdala y amígdala extendida; 5, 6, 8). La correcta intercomunicación entre estas estructuras permite una adecuada toma de decisiones, control de impulsos, sensación de recompensa, motivación, regulación del estrés, funciones ejecutivas, interoceptivas y memoria (6). Dichas funciones se ven alteradas en el SUD debido a cambios neuroplásticos maladaptativos producidos por la liberación de múltiples neurotransmisores (1, 5, 6, 8). Estos cambios maladaptativos repercuten en los umbrales de activación de dichas regiones: en el consumo agudo, se ve una reducción del umbral de activación, lo que se manifiesta con la sensación de recompensa; en el consumo crónico, a la abstinencia de la sustancia, se observa un incremento en su umbral de activación, lo que provoca la sensación disfórica (5).

- **Saliencia incentiva**

En el contexto del aprendizaje asociativo, la “saliencia incentiva” se define como una motivación a una recompensa. Las células dopaminérgicas del circuito meso-cortico-límbico se activan en respuesta a estímulos de recompensa, creando la sensación de recompensa o *liking*. Tras la estimulación crónica, se induce un proceso de neuroadaptación en circuitos de los ganglios basales, provocando que las neuronas dopaminérgicas dejen de enviar respuesta durante el estímulo para parearse con estímulos previamente neutros que anticipan el estímulo de recompensa. Esta anticipación hace que el *liking* se convierta en una sensación de ansia o *wanting*. Así, los estímulos previamente neutros (ambientes, personas, situaciones específicas) se convierten en incentivos, pasando de un trastorno impulsivo a uno compulsivo mediante un aprendizaje asociativo (1, 5, 6, 8, 12). De esta forma, las drogas de abuso crean una fuerte motivación que propicia la búsqueda y consumo de las mismas (8).

- **Abstinencia:**

En un adicto, los circuitos motivacionales y de recompensa se ven reorientados por procesos de neuroadaptación comandados por la droga de consumo (8). El incremento en el umbral de disparo de las células dopaminérgicas hace que cada vez sea más difícil activar estructuras relacionadas con el sistema de recompensa, tanto con estímulos relacionados a la droga como estímulos independientes a la droga (6, 8). Como resultado de lo anterior, el grado de euforia que producen los estímulos se va atenuando, provocando una falta de motivación hacia estímulos cotidianos (8). Aunado a esto, ocurren alteraciones en los circuitos relacionados a la amígdala extendida, lo que provoca una reacción exagerada al estrés con la consecuente emergencia de estados emocionales negativos (5, 6, 8). Este sistema antirecompensa (*antireward system*) es avivado por neurotransmisores involucrados en la homeostasis a la respuesta al estrés, tales como factor liberador de corticotropina (CRF) y dinorfinas. (5, 8). En resumen, la persona con SUD sufre una transición de consumir por sentir placer a consumir para evitar la angustia cuando no están intoxicados. Desafortunadamente, a pesar de que el consumo de drogas alivia la angustia a corto plazo, su consumo repetido exacerba la disforia durante la abstinencia, provocando un ciclo iterativo. (8)

- **Preocupación/Ansia y Anticipación (*Craving*):**

Esta etapa parece ser un elemento clave para explicar la recaída de los sujetos en esta patología (5, 6). Los circuitos relacionados con regiones de la corteza prefrontal están involucrados con funciones ejecutivas tales como toma de decisiones, mantención sostenida de la atención, memoria de trabajo, reconocimiento de objetos. Las drogas de abuso provocan alteraciones en la señalización dopaminérgica en estas regiones prefrontales, de

manera similar a las ocurridas en el sistema de recompensa (previamente comentado). De forma paralela, también se producen cambios en las señalizaciones glutamatérgicas en estas mismas zonas. Como consecuencia de ambas alteraciones, el individuo experimenta una incapacidad para resistir la sensación de urgencia de consumir la droga (8).

Etapa	Área	Homólogo en rata
Intoxicación	Estriado dorsal (DS) o Caudado-Putamen (CPu)	DS o CPu
	Globo Pálido (GP)	GP
	Tálamo	Tálamo
	Área Tegmental Ventral	VTA
Abstinencia o efectos negativos	Núcleo Accumbens (NAc)	NAc
	Núcleo Basal de la estria terminal (BNST)	BNST
	Núcleo central de la amígdala	CeA
	VTA	VTA
	Habénula	Núcleo habenular lateral
Preocupación o Anticipación	Corteza del cíngulo anterior (ACC)	ACC
	Corteza Prefrontal dorsolateral (dlPFC)	Corteza prelímbica (PL)
	Corteza Prefrontal ventromedial (vmPFC)	Corteza infralímbica (IL)
	Corteza Orbitofrontal (OFC)	OFC
	Hipocampo (HPC)	CA1 y giro dentado (DG)
	Ínsula (Ins)	Ins
	Amígdala basolateral	Amígdala
	BNST	BNST

Tabla 1: Áreas afectadas en el ciclo de la adicción. Compilación de las áreas cerebrales humanas afectadas en las tres etapas del ciclo de la adicción y su homólogo en ratas. Estas áreas homologadas se encuentran en el atlas de Fischer <http://www.nearlab.xyz/fischer344atlas>

Siendo descrita una “droga de abuso” como una sustancia psicoactiva que se caracteriza por una búsqueda compulsiva, un consumo incontrolable y que su ausencia provoca el síndrome de abstinencia, se puede entonces clasificar al “alcohol” como una droga de abuso y al “alcoholismo” o “trastorno por uso de alcohol” (AUD por sus siglas en ingles *Alcohol Use Disorder*) como a la adicción a dicha sustancia (3).

II.2) Trastorno por uso de Alcohol (AUD)

Dentro de la variedad de sustancias psicotrópicas, el alcohol es la que tiene mayor prevalencia. El alcohol es una sustancia de fácil asequibilidad, lo que la convierte en una sustancia ubicua. Debido a esto, el alcohol se ha convertido en una de las principales drogas de abuso (1, 3). Por sus efectos, el alcohol es un sedante/hipnótico, y su consumo intenso y prolongado origina dependencia, provocando AUD (3).

En 1994, la *American Psychiatric Association* definió al alcoholismo o dependencia al alcohol como una enfermedad crónica, recidivante, progresiva, perjudicial para la salud. El desarrollo de la dependencia al alcohol se caracteriza por: 1) frecuentes episodios de intoxicación, 2) anticipación, 3) uso a pesar de consecuencias negativas para la vida del individuo, 4) pérdida del control de su ingesta, y 5) la aparición del síndrome de abstinencia al interrumpir el consumo de dicha droga (15). Diversas investigaciones han reportado que el consumo de alcohol (etanol) es tóxico para los tejidos, produciendo cambios a nivel cardiovascular, digestivo, músculo-esquelético y en sistema nervioso (16). En el sistema nervioso central (SNC), a grandes rasgos, produce un efecto depresor sobre funciones neuronales, creando cambios maladaptativos neuronales en circuitos relacionados con la corteza prefrontal, la recompensa y la respuesta al estrés con su consumo crónico (5, 6, 8).

Partiendo de que el BDMA se fundamenta en que todo cambio psicológico se debe a un cambio neurobiológico, la comprensión de los cambios metabólicos producidos por el consumo de alcohol es importante para a la comprensión de los cambios macroscópicos y las manifestaciones características del trastorno por consumo de alcohol.

II.3) Modelos de alcohol

Partiendo de un modelo de alcohol previamente establecido en el laboratorio (113, 114) que implica el acceso intermitente a dos botellas de alcohol, nuestro objetivo principal fue analizar las diferencias en las características estructurales a nivel macroscópico y microscópico entre las ratas expuestas y no expuestas al alcohol. A continuación, presentaremos los fundamentos teóricos que respaldan la base de este modelo.

Un modelo se define como la representación de un fenómeno que permite su estudio para obtener un mayor conocimiento sobre el mismo (85). Los modelos murinos son ampliamente utilizados en el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas (55, 56), ya que facilitan la investigación extensa del cerebro en estas patologías. El Trastorno por Uso de Alcohol

(AUD) como enfermedad neuropsiquiátrica ha sido desafiante, ya que hasta ahora, ningún modelo animal ha logrado replicar completamente las condiciones humanas (1). Para lograr una representación del AUD, el consumo voluntario es una característica clave, y los modelos de acceso intermitente a alcohol han permitido desarrollar un patrón de consumo voluntario, crónico y escalonado (61). En este estudio, hemos empleado el modelo de Acceso Intermitente a Alcohol al 20%, según lo establecido por Simms (2008; 58).

En 1973, Wise estableció el modelo de Consumo Intermitente de Alcohol a Dos Botellas (IA2BC). En este modelo, las ratas tienen acceso a dos botellas durante los 7 días de la semana para su consumo ad libitum. Durante tres días de la semana (lunes, miércoles y viernes), las ratas tienen acceso a una botella de agua y otra con etanol al 20% diluido con agua. En los días restantes (martes, jueves, sábado y domingo), tienen acceso a dos botellas con agua. Este modelo (IA2BC), implementado durante la fase nocturna de las ratas, ha demostrado recrear un patrón de consumo similar al trastorno por uso de alcohol en humanos (61). Por esta razón, hemos seleccionado este modelo para estudiar el consumo crónico voluntario en nuestro estudio.

Simms amplió este trabajo encontrando que el modelo de IA2BC puede utilizarse para lograr que las ratas consuman alcohol al 20% en niveles altos (5-6g/Kg/24h). Además, observó que cerca del 30% de las ratas alcanzan concentraciones de alcohol en sangre (BEC) entre 90-100 mg/dL, cumpliendo con uno de los criterios establecidos por el Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) para determinar el consumo excesivo de alcohol en humanos (58, 65).

El AUD se caracteriza por un consumo progresivo de alcohol, donde se repite el ciclo de intoxicación, abstinencia y anticipación (139). La exposición intermitente a dos botellas de elección libre ha demostrado inducir un consumo voluntario gradualmente escalonado de alcohol, alcanzando niveles de 5-6 g/kg/24h (Tabla 2). Además, al comparar el acceso intermitente con el acceso continuo, se ha observado que el acceso intermitente induce mayores niveles de consumo de alcohol (139). Además, el IA2BC brinda la posibilidad de abordar diferentes aspectos relacionados con el AUD, como la transición de consumo social a consumo excesivo, atracones y recaídas, por lo que es un modelo deseado para la evaluación preclínica del AUD (139).

El IA2BC es un procedimiento eficaz para inducir el consumo voluntario de alcohol que presenta varias ventajas: 1) permite entrenar a las ratas en el consumo voluntario de alcohol sin la ayuda de iniciadores (por ejemplo, glucosa), evitando covariables que podrían oscurecer la interpretación; 2) el consumo aumentará gradualmente de leve a severo, imitando la transición del consumo social al excesivo en los humanos; 3) de manera crónica, establece episodios tipo atracones; 4) este procedimiento produce neuroadaptación molecular, celular y conductual, todos relevantes para el estudio del AUD. Además, este procedimiento muestra tres medidas de validez: a) Validez aparente, dada su similitud con el patrón de consumo humano; b) Validez de constructo, debido a su alta correlación entre BAC y el consumo de alcohol, y la neuroadaptación; c) Validez predictiva, ya que el tratamiento con drogas que suprimen el consumo de alcohol (naltrexona y acamprosato) también suprimen el consumo en este modelo (139).

Como limitaciones de este modelo, se encuentran: 1) solo el 50-80% de las ratas escalan hasta niveles excesivos de consumo (aunque esta variabilidad también contribuye a la validez del modelo); 2) aunque se alcanzan niveles de consumo alto, este modelo no puede modelar la dependencia al alcohol como otros modelos (por ejemplo, cámaras de vapor); 3) la falta de efectos conductuales en la abstinencia a largo plazo y la falta de efectos de privación del alcohol no se observan en este modelo, sugiriendo que es un modelo de abuso más que de dependencia de alcohol (139).

Cepa	Consumo Inicial (g/hg/24h)	Consumo final (g/hg/24h)	Concentraciones de alcohol en sangre	Estudio
Wistar	~1.5-3	5.8 ± 0.8	Range 4-93 mg% R ² = 0.63 (30 min)	Simms et al., 2008
Wistar	~3-4	~5.2	Range ~7-61 mg% R ² = 0.85 (60 min)	Cippitelli et al., 2012
Wistar	~1	~4.2	NA	Wise, 1973
Wistar	~1	~3.6	~58 mg% (120 min)	George et al., 2012
Wistar	~3.7-4.2	3.4 ± 0.56	NA	Adermark et al., 2011

Tabla 2: Comparación de diferentes estudios empleando el IA2BC. Modificado de Carnicella, 2014

II.4) Células del Tejido Nervioso: Glía

"Neuroglía" o "glía" es el término colectivo utilizado para referirse a células de origen neuroepitelial, como los oligodendrocitos, astrocitos y células ependimales, así como a aquellas derivadas de la cresta neural, denominadas glía periférica, y de origen mielóide, conocidas como microglía (133). La neuroglía constituye la mayor población de células en el tejido nervioso y, junto con las neuronas, forma conjuntos que son fundamentales para las funciones cognitivas (134).

Históricamente, se ha llegado a un consenso en que los cambios en la apariencia de la neuroglía actúan como indicadores de daño en el Sistema Nervioso Central (SNC) (132). Se ha acuñado el término "gliosis," derivado del sufijo latino "-osis," que denota enfermedad, para referirse a las alteraciones en la glía. En este contexto, el término "astrocitosis" se

emplea para describir el remodelamiento de los astrocitos en condiciones patológicas. Además, se ha reconocido el papel de los astrocitos reactivos en la formación de "cicatrices" para reparar el tejido nervioso, proceso visualizado en diferentes niveles y denominado "cicatriz glial" (132, 5). Por lo tanto, la "gliosis" y las "cicatrices gliales" se han asociado a procesos patológicos. A pesar de esto, no existe una nomenclatura unificadora que defina estos conceptos de manera consistente (132).

Aunque el término "neuroglía" engloba a diversas células, como astrocitos, microglía, oligodendrocitos, células ependimales, células de Schwann y células de Bergmann, entre otras, en este contexto nos enfocaremos brevemente en la descripción de los astrocitos y la microglía, ya que son de particular interés para nuestra tesis.

Astrocitos

Los astrocitos, células de morfología estrellada, desempeñan funciones tróficas, estructurales y metabólicas en el Sistema Nervioso Central (SNC). Constituyen el tipo celular más prevalente en el tejido nervioso de mamíferos, representando entre el 20% y el 50% de las poblaciones celulares (137,138).

Estas células cumplen roles homeostáticos cruciales, formando parte integral de la barrera hematoencefálica, donde actúan como defensores y proveedores de soporte energético. Además, poseen maquinaria para metabolizar compuestos y mantener el equilibrio redox. Los astrocitos también participan en el sistema glinfático y desempeñan funciones esenciales en la coordinación de la formación y función de sinapsis, supervivencia neuronal y guía axonal. Su implicación en el establecimiento de circuitos neuronales ha llevado a la hipótesis de que alteraciones en este tipo de células gliales pueden contribuir a neuropatologías (137).

La proteína ácida fibrilar (GFAP) constituye un componente importante de los filamentos intermedios de los astrocitos y se utiliza ampliamente como marcador de reactividad astrocitaria o astrogliosis (132). Es relevante destacar que el aumento de GFAP también puede producirse en situaciones fisiológicas como actividad física, ambientes enriquecidos, exposición a glucocorticoides, variaciones del ciclo circadiano y plasticidad adaptativa (132).

Microglia

En su calidad de residentes en el parénquima cerebral, la microglía desempeña diversas funciones en el Sistema Nervioso Central (SNC), como la gliogénesis, vasculogénesis, neurogénesis, mielinización, regulación sináptica y fagocitosis (132). Para llevar a cabo estas funciones, la microglía requiere una variedad de receptores que le permitan detectar cambios en el entorno, manteniéndose dinámica y receptiva a su medio. En el cerebro maduro, la distribución de la microglía suele ser más uniforme, con cierto grado de superposición entre territorios.

La microglía genera un amplio espectro de moléculas señalizadoras, desde citocinas hasta neurotransmisores y proteínas de la matriz extracelular, capaces de regular la actividad neuronal, sináptica y plasticidad funcional (135). Es crucial destacar que la microglía no solo

responde a estímulos locales, sino que también recibe estímulos de la periferia. Un ejemplo de esto es el "comportamiento de enfermedad" (sickness behavior), que constituye una respuesta del Sistema Nervioso Central (SNC) a la producción de citocinas en la periferia (132, 107, 108, 109).

La identificación de la microglía se fundamenta en la expresión específica de genes designados como "marcadores microgliales" (131). En términos generales, se considera que la microglía en mamíferos puede identificarse mediante marcadores como los factores de transcripción Pu.116, las proteínas citoplasmáticas Iba1, y las proteínas de superficie, tales como los receptores purinérgicos P2Y₁₂, los transmembranales TMEM119 y CSF1R.34 (132). No obstante, es importante tener en cuenta que algunos de estos marcadores pueden regularse de manera diferente en estados patológicos y también pueden expresarse en poblaciones de macrófagos cerebrales (BAM: macrófagos asociados al borde) residentes en el espacio perivascular y leptomeninges (132).

II.5) Relación Neuronas-Astroцитos-microglía

Como se ha visto, la complejidad del sistema nervioso se debe en gran medida a la intrincada relación entre sus diversos componentes. Aunque las neuronas han sido el principal foco de estudio debido a su función como unidades fundamentales de la comunicación neuronal, es importante tener en cuenta la estrecha relación de los diferentes constructos del tejido nervioso para comprender mejor su función en estados fisiológicos y su respuesta a condiciones patológicas. Por lo tanto, para obtener una visión más completa de los cambios en la homeostasis cerebral, es necesario considerar un tercer elemento celular especializado en la vigilancia y la respuesta a cambios de los microambiente cerebrales: la microglía.

La microglía es altamente dinámica y muestra una notable heterogeneidad reflejada en cambios constantes en su estado génico, morfológico y funcional (95). Esta heterogeneidad se debe a la presencia de múltiples receptores, como purinoreceptores canales iónicos y receptores de neurotransmisores. Estos, le otorgan a la microglía una gran sensibilidad a los diferentes microambientes cerebrales y le permiten desempeñar diferentes funciones, como modulación sináptica, reorganización de circuitos neuronales y producción de péptidos antimicrobianos (95). Por ejemplo, la activación de canales de iones y receptores membranales produce alteraciones en su potencial de membrana, conduciendo a cambios morfológicos, motiles, de supervivencia, entre otros (95). En contraste, la activación de receptores P2Y₁₂ por ATP resulta en migración y extensión de procesos hacia el tejido dañado (95).

Esta estimulación e inhibición de diferentes receptores, lleva a la microglía a cambios morfológicos, incremento en su proliferación, migración hacia el sitio de lesión, incremento de su actividad fagocítica, activación de inflamomas y liberación de mediadores proinflamatorios (96). De esta forma, durante un estado patológico, la microglía expresa una gran variedad de fenotipos que pueden resultar benéficos o perjudiciales dependiendo el contexto (97). Dada su irritabilidad a los microambientes, la microglía es una pieza clave

para comprender y abordar enfermedades neurológicas y trastornos del sistema nervioso central (95, 97)

Recientemente, se ha visto que la captura de glutamato por neuronas está facilitada por fractalcina, una quimiocina producida por las propias neuronas, que además promueve la neuroprotección por parte de la microglía, las únicas células que presentan receptores a fractalcina (98). Interesantemente, esta acción requiere de la comunicación neurona-astrocito-microglía (98). Asimismo, la liberación de glutamato por parte de los astrocitos requiere de TNF- α , la cuál es mayormente producida por la microglía; de hecho, la sobreexpresión de TNF- α puede conducir a la excitotoxicidad neuronal (95).

En cuanto a la respuesta al daño neuronal, los astrocitos intentan proteger y reparar el daño causado. Los astrocitos activados se caracterizan por una morfología, funcionalidad y patrón molecular diferentes a los astrocitos en estado basal (95). La proteína ácida gliofibrilar astrocitaria (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), ubicada en el citoesqueleto de los astrocitos, en situaciones de activación astrocitaria, se extiende altamente y sirve como marcador de la reactividad astrocitaria (95). Los astrocitos reactivos son esenciales en la formación de cicatrices, inhibición de la diseminación inflamatoria y reparación de la barrera hematoencefálica (95). Por su parte, ante el daño, la microglía se activa, presentando un cambio morfológico que incluye un alargamiento del cuerpo celular y un acortamiento y engrosamiento de sus procesos, lo que le da un aspecto más ameboide y le permite migrar hacia el sitio de daño (99). Estos cambios morfológicos están asociados con la expresión de moléculas inflamatorias en respuesta a las alteraciones en el microambiente cerebral. La molécula adaptadora de unión a calcio 1 (Iba-1: *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) es un marcador clásico de microglía. Iba-1 se encarga de agrupar la actina y remodelación citomembranal para la fagocitosis en microglía y macrófagos (99). Clásicamente, la microglía activada se clasificaba en dos tipos: M1 (proinflamatorio) y M2 (reparador; 99). Sin embargo, actualmente se ha visto que existe una gran variedad de perfiles específicos para cada microambiente (95).

En resumen, los astrocitos desempeñan un papel crucial al proporcionar sustratos metabólicos y mantener la homeostasis iónica y sináptica; mientras que la microglía supervisa y también es capaz de modular la actividad neuronal en la sinapsis. Así, tanto las neuronas como la glía son necesarias para una sinapsis funcional y, por lo tanto, el moldeamiento de circuitos neuronales (95).

II.6) Plasticidad sináptica: Neuronas, Astrocitos y Microglía

Las sinapsis son las estructuras fundamentales de los circuitos neuronales, permitiendo la transmisión de información entre neuronas (101). La complejidad en las redes neuronales radica en los cambios dinámicos de las conexiones neuronales, conocidos como plasticidad sináptica. Esta plasticidad sináptica está ampliamente regulada en parte por las células gliales (25).

Por ejemplo, los astrocitos liberan TGF- β e IL-33 provocando que la microglía fagocite neuronas y sinapsis neuronales (95). Además, la microglía expresa TREM2, lo que regula la recaptura de neurotransmisores sinápticos por parte de los astrocitos (95). La microglía también regula procesos neurobiológicos, como la formación de circuitos neuronales y sinapsis, y la regulación de factores neurotróficos, angiogénicos y metabolismo de aminoácidos (100). Todos estos procesos son esenciales para la neuroplasticidad, por lo que alteraciones en la microglía podrían comprometer la neuroplasticidad (100).

Por su parte, los astrocitos forman redes a través de uniones tipo gap, que intervienen en el desarrollo sináptico, modificaciones sinápticas (Homeostáticas o Hebianas), y el monitoreo de la actividad eléctrica neuronal mediante receptores ionotrópicos (102). De esta manera, los procesos de formación de circuitos neuronales a través de conexiones sinápticas moldean las bases funcionales del cerebro y conductuales del organismo (101).

Considerando la exhaustiva complementariedad entre estas células, cambios en la función de unas repercutirá en las otras. Aunado a esto, es importante considerar que la cronicidad de las condiciones es un factor importante para el escalamiento de estos efectos. Actualmente se está investigando la contribución de la glía en procesos neurodegenerativos y el restablecimiento de su función como alternativa terapéutica (37).

II.7) Neuroinflamación, Gliopatía y Plasticidad Maladaptativa

Estudios indican que etapas tempranas de procesos neurodegenerativos están asociados a procesos neuroinflamatorios. La neuroinflamación es una respuesta celular coordinada del tejido dañado. Mientras que la adecuada regulación de esta respuesta facilita la recuperación del tejido, un proceso inflamatorio excesivo puede inducir a un daño secundario (25).

Durante el proceso neuroinflamatorio, se liberan factores proinflamatorios que desencadenan la activación de la microglía y astrocitos, modificando su fenotipo y provocando un reacomodamiento de su estructura citoesquelética y expresión proteica. Tanto la microglía y los astrocitos liberan mediadores inflamatorios, promoviendo una retroalimentación positiva entre estas dos células. La activación de astrocitos se caracteriza por su hipertrofia e incremento de la expresión de GFAP, un fenómeno llamado Gliosis (33). Por su parte, la activación de la microglía se caracteriza por un aumento de su soma y retracción de sus prolongaciones, e incremento de la expresión de Iba-1 (97). Este cambio fenotípico, dependiendo las condiciones, puede llevar a un desbalance en la homeostasis de los neurotransmisores, disrupción de la conectividad sináptica y muerte neuronal. Esto puede ser causado por una alteración de las propiedades regulatorias de los astrocitos y la microglía, resultando en un aumento de la excitotoxicidad y un mal acoplamiento de los mecanismos metabólicos y antioxidantes (25). Esta alteración en las dinámicas celulares conduce a una plasticidad maladaptativa (25).

A medida que se ha ido comprendiendo mejor la interacción entre neuronas, astrocitos y microglía, nuevos descubrimientos están emergiendo sobre los mecanismos en los que esta

interacción determina el inicio, progreso y resultado de procesos. Este tipo de enfoque se está aplicando a patologías como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y Huntingtons, epilepsia y desordenes cognitivos tales como la esquizofrenia, depresión y el trastorno por uso de sustancias (25, 33, 38).

II.8) Neuronas, Astrocitos y microglía en el Trastorno por consumo de Alcohol

Una vez comprendido cómo el funcionamiento del sistema nervioso depende de la adecuada sinergia entre sus tipos celulares debido a su complementariedad, se sigue que, la alteración en el funcionamiento de uno de estos elementos por la exposición a etanol repercutirá en el otro y viceversa. Dicho funcionamiento se puede ver perturbado por efectos directos del etanol o indirectamente mediante efectos del etanol sobre la neurotransmisión o el metabolismo astrocítico-neuronal (33, 40, 102).

La exposición al alcohol provoca una marcada inhibición en la proliferación de neuronas y astrocitos. Esto es debido a una reducción en la síntesis de ADN y proteínas: en las neuronas se puede ver una reducción en la expresión de NeuN, en los astrocitos de GFAP. Tras una exposición prolongada, esta inhibición puede dar paso a un decremento en el número celular debido a la incapacidad para llevar a cabo sus funciones de manera adecuada. Por otro lado, pese a que el etanol inhibe la proliferación celular, también se ha visto una activación de astrocitos tipo gliosis, lo que resultaría en un aumento de expresión de GFAP (26, 41).

Además de ser un agente proinflamatorio *per se*, se ha hipotetizado que el alcohol altera el espectro de activación de la microglía, resultando la amplificación de los efectos nocivos del alcohol (104). A su vez la expresión de genes proinflamatorios microgliales altera la actividad glutamatérgica. Esto se ha observado en la amígdala central y corteza prefrontal media (103, 105). Esto contribuye al escalonamiento que se observa en el trastorno por consumo de alcohol (105).

En resumen, se ha observado que la acumulación de efectos deletéreos causados por la exposición crónica al alcohol, altera la dinámica microglía-astrocito-neurona, lo que podría contribuir a la degeneración de estos tipos celulares (26, 103). A su vez, esta degeneración pudiera desencadenar una activación secundaria de células gliales, la cual se vería reflejada en un incremento de la producción de GFAP, Iba-1 y cambios glióticos.

II.9) Resonancia Magnética en el Trastorno por consumo de Alcohol

El AUD es una enfermedad que resulta en una alteración conductual, la cual está vinculada a cambios en el funcionamiento y metabolismo celular (25, 42). Estas anomalías se ven reflejadas mediante cambios estructurales en diferentes regiones cerebrales que controlan el consumo de sustancias recompensantes (sistema de recompensas), así como áreas involucradas en la regulación cognitiva (regiones frontales) y emocional (sistema límbico;

25). En pacientes con AUD, se han reportado alteraciones estructurales tanto en sustancia gris como en sustancia blanca (25, 42, 109).

En la sustancia gris (GM), se ha observado afectación principalmente en áreas frontales (prelímbrica e infralímbrica), diencefálicas (tálamo), hipocampales, y cerebelares en comparación con sujetos controles (109, 110). Por ejemplo, se ha reportado que la disminución de la sustancia gris en regiones estriatales, frontales y talámicas está asociada con el tiempo de consumo. Asimismo, se ha observado una interacción entre los efectos del alcohol y la edad en estos cambios (109).

En la sustancia blanca (WM), se ha reportado degeneración en el cuerpo calloso, cápsula interna y externa, fornix, forceps frontal, cíngulo superior y fascículo longitudinal (109). En estas regiones, los cambios en WM se perciben como una disminución de la fracción de anisotropía (FA) y un aumento en la difusividad promedio (MD). Esta disminución en FA podría reflejar una menor densidad neurítica y/o una mayor dispersión en la orientación de las neuritas (109).

Sin embargo, existe una falta de solidez en la evidencia de las asociaciones entre el consumo de alcohol y los cambios estructurales en la población general (111). Esto podría deberse a que la muestra estudiada muestra una gran heterogeneidad en cuanto a predisposición genética, edad de inicio, patrón de consumo, frecuencia de resaca, duración del estado de sobriedad, y estado nutricional y hepático. Por lo tanto, caracterizar las regiones cerebrales afectadas únicamente por el alcohol ha sido un reto (111). Frente a esta problemática, los modelos animales han representado una ventaja al poder controlar diversas variables, permitiendo estudiar los efectos depurados del alcohol (111). Sin embargo, los modelos animales también presentan limitaciones translacionales al no tener una correspondencia exacta con el humano y presentar algunos procesos fisiológicos distintos (111).

Grosso modo, los efectos del alcohol causan una reducción de la sustancia gris (108). Inicialmente, se creía que afectaba la función cerebral global, no obstante, estudios análisis morfométricos más avanzados han demostrado que la disminución volumétrica es más significativa en regiones específicas (45, 73, 74). Mechtcheriakov et al. (2007) llevaron a cabo un análisis de morfometría basado en voxel donde detectaron disminuciones de volumen en la corteza frontal, hipocampo posterior y tálamo. Cerdénar et al. (2007) y Grodin et al. (2013) añaden la corteza insular y el cerebelo en esta lista (89, 90). Entre las regiones con mayor concordancia encontramos: la corteza prefrontal, tálamo, ganglios basales e hipocampo (75, 76, 77, 78, 87). Sullivan et al. (2005) demostraron que, además de la tendencia a la disminución del volumen en el hipocampo, había mayor disminución en el lado derecho sobre el izquierdo (87).

Esta evidencia nos señala la importancia de la implementación de análisis morfométricos en IRM como técnicas sensible para detectar diferencias de volumen a nivel local. Sin embargo, una limitación de este tipo de enfoque es la falta de especificidad en cuanto a la causalidad de las diferencias volumétricas observadas, ya que múltiples variables pueden contribuir a estos cambios.

Estudio	Modelo de Alcohol	Muestra Hembras (H) Machos (M)	Criterio de alcohol	MRI
Pfefferbaum et al, 2015	Modelo de administración intragástrica	Ratas Wistar experimental (n=22), controles (n=11)	BAL (250mg/dL)	Disminución de FA en cuerpo calloso (rodilla) y fimbria-fórnix durante el atracón e incremento en MD en fimbria-fornix
Dudek et al, 2015	Consumo voluntario de alcohol al 10% y administración de cloruro de manganeso	Ratas macho AA (n=42)	Consumo de EtOH	Incremento en la actividad cerebral en las vías mesocorticolímbicas y nigrostriatales
Dudek & Hyttiä, 2016	Consumo voluntario de alcohol al 10% y administración de Cloruro de Manganeso	Ratas macho AA (n=58) ratas macho Wistar (n=8)	Consumo de alcohol	Menor actividad e las ratas AA vs Wistar en Cli y VTA ventral con fMRI
Vetreno et al, 2016	AIE intragastrico	Rata Wistar macho (n=32)	BEC	AD mostró reducción en cerebelo, neocorteza e hipocampo
Chen et al, 2017	Modelo de intoxicación intragastrica	Ratas macho Sprague-Dawley (n=35) 3 grupos de intoxicación aguda y un grupo control (n=5)	EtOH intoxicación	Decremento de MK, FA y MD en lóbulo frontal y tálamo
Perez-Ramirez et al, 2017	IA2BC al 10%	Ratas macho Marchigian Sardinian (msP) (n=18)	Consumo de alcohol	Decremento en la CRF en el área retrosplenial visual y la red del estriado, en ratas alcohólicas y un incremento en la CF entre las redes prefrontal-cingulada y estriatal
Vetreno et al, 2017	AIE 20%	Ratas macho, Wistar, 10AIE y 10 control en P21	BEC	Incremento de volumen en corteza cerebral, estriado e hiotálamo y decremento del cuerpo calloso, cerebelo e hipocampo
Zhao et al, 2018	Administración de alcohol vía oral al 20%	Ratas macho, Wistar (n=25)	BAL	Contracción no reversible en los nucleos pretecales y los colículos superiores e inferiores

Tabla 3: Resultados de estudios científicos sobre investigaciones en consumo de alcohol utilizando Imágenes de Resonancia Magnética (IRM)

II.10) Hallazgos celulares en el AUD

En 2018, Zhe et al. (88) llevaron a cabo un estudio que se centró en un modelo de exposición aguda forzada al alcohol en ratas P35. Durante 4 días, las ratas tuvieron acceso exclusivo al alcohol durante 8 horas al día. En este experimento, se investigaron los cambios celulares en el hipocampo, específicamente en las neuronas maduras (marcadas por NeuN), neuronas inmaduras (identificadas por DCX), astrocitos (detectados mediante GFAP) y microglía (caracterizada por Iba1). Los resultados de este estudio revelaron una disminución del 75% (Ctr:417; EtOH: 112; $p=0.0003$) en neuronas marcadas con NeuN, 66% (Ctr:87; EtOH: 34; $p=0.0041$), un aumento en la presencia de microglía (Ctr:17; EtOH: 121; $p=0.0021$) y no se encontraron diferencias significativas en la población de astrocitos (Ctr:364; EtOH: 321; $p=0.3290$).

Por otra parte, Goodlet et al. (31) diseñaron un experimento de exposición al alcohol utilizando una gastrostomía para implantar una sonda a través de la cual se exponían a alcohol a ratas recién nacidas en el día P4. En este estudio, Goodlet informó cambios en la concentración de GFAP (proteína fibrilar ácida glial) mediante el uso de radioinmunoensayo. Los resultados indicaron un aumento en la concentración de GFAP en relación directa con la concentración de alcohol. Además, se examinaron diferentes regiones cerebrales, como la corteza, el hipocampo y el cerebelo. Mientras los grupos controles tenían 0.22ug/mg de proteína y 0.25ug/mg de proteína (con gastrostomía) en la zona de la Corteza cerebral, los grupos a los que se dieron soluciones de etanol al 2.5%, 5.1% y 10.2%, se observó 0.4ug/mg de proteína, 0.5ug/mg de proteína y 0.9ug/mg ($p<0.01$) de proteína de GFAP. En Hipocampo se observó 0.9um/mg para controles, 1.3ug/mg (gastrostomía), 1.2ug/mg (EtOH2.5%), 1.1ug/mg (EtOH 5.1%) y 1.5ug/mg (EtOH10.2%; $p<0.001$). En Cerebelo se observó 0.9um/mg para controles, 1.3ug/mg (gastrostomía), 1.2ug/mg (EtOH2.5%), 1.1ug/mg (EtOH 5.1%) y 1.5ug/mg (EtOH10.2%; $p<0.001$).

A partir de las investigaciones mencionadas, es posible concluir que el alcohol provoca modificaciones en la población celular en el cerebro. Estas alteraciones celulares son específicas para cada región y pueden manifestarse de manera diferente en neuronas, microglía y astrocitos. Estos hallazgos subrayan la importancia de comprender los efectos específicos del alcohol en diferentes áreas cerebrales.

II.11) Correlación de cambios celulares con los cambios volumétricos

Un estudio reciente (90) utilizó morfometría basada en voxel para analizar los cambios relacionados con la edad en ratas en tres intervalos de tiempo dentro de un período de 12 semanas. A través de una ventana de imagenología in vivo, los investigadores observaron los cambios a nivel cortical en áreas específicas para evaluar aumentos o disminuciones en el volumen. Además, correlacionaron estos cambios con diferentes métricas: conteo de núcleos celulares, la distancia a núcleos vecinos y el volumen nuclear. Este estudio llegó a la conclusión de que los cambios en el volumen determinados por la resonancia magnética estaban relacionados con modificaciones en la cantidad de células, la agrupación celular y el volumen nuclear. Sin embargo, señalaron la necesidad de diferenciar entre tipos celulares para lograr una caracterización más completa (90).

Estos estudios subrayan la importancia de alcanzar una caracterización más precisa. Por un lado, la resonancia magnética, a través de los análisis de morfometría, ofrece una herramienta objetiva para identificar áreas de interés donde puedan existir diferencias entre los grupos experimentales y de control. No obstante, estos cambios no proporcionan información sobre la naturaleza de las células afectadas. Esta carencia de especificidad podría abordarse mediante el examen histológico detallado de las regiones en cuestión, lo que permitiría un análisis más minucioso de los cambios observados.

De lo anterior, se desprende la imperiosa necesidad de adoptar enfoques que involucren diversas técnicas para alcanzar una caracterización más completa de las alteraciones patológicas asociadas al trastorno por consumo de alcohol (90). Integrar diferentes métodos de análisis, como la resonancia magnética y la histología, es esencial para obtener una comprensión más precisa y detallada de los cambios que ocurren en el cerebro en respuesta al consumo de alcohol.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los cambios macroscópicos y microscópicos en un modelo de consumo crónico de alcohol y cómo se relacionan entre ellos?

Hipótesis

H1: Existirán diferencias volumétricas cerebrales detectables por resonancia magnética. Habrá un mayor volumen en corteza prefrontal, estriado ventral, estriado dorsal, área tegmental ventral; y un menor volumen en hipocampo y cerebelo en ratas en el grupo de consumo crónico de alcohol comparadas con el grupo control.

H2: Existirán diferencias en el conteo neuronal, astrocitaria y microglial detectables mediante inmunofluorescencia (NeuN, GFAP e Iba1) en las regiones de interés marcadas por análisis volumétricos.

H3: Existirá una relación lineal entre los cambios macroestructurales (jacobiano) y microestructurales (conteo celular) comprobable mediante una regresión múltiple.

Objetivo General

Basados en un modelo de consumo crónico por alcohol, determinar los cambios macroscópicos por resonancia magnética y microscópicos por inmunofluorescencia y establecer si existe una relación entre ellos.

Objetivos Particulares

- Basados en un modelo de alcoholismo crónico, identificar las diferencias de volumen en regiones cerebrales mediante morfometría basada en deformación por medio de resonancia magnética estructural.
- Cuantificar las diferencias de conteo neuronal, astrocitaria y microglial mediante inmunofluorescencia indirecta en las regiones de interés señaladas por la resonancia magnética y evidencia previa.
- Establecer si existe una relación entre las diferencias morfométricas observadas mediante resonancia magnética y los cambios poblacionales de neuronas, astrocitos y microglía cuantificables por inmunofluorescencia.

Capítulo III

Metodología

III.1) Modelo Experimental

Para la realización de este experimento se utilizaron ratas Wistar criadas en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) desde su destete en el día 21 postnatal (P21), hasta su sacrificio (P145). Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el uso y cuidado de animales. El cálculo de la muestra se obtuvo basado en criterios de neuroimagen y en el porcentaje de ratas que presentarán el fenotipo alcohólico. En cuanto a neuroimagen, Lerch (69) establece obtener un poder de 80% con un α de 0.05, por lo que se requiere de una muestra de al menos $n \sim 16$ por grupo. Ya que se usarán 2 grupos (control y experimental), se requiere de una muestra final de $n \sim 40$ (20 por grupo). En cuanto al modelo de etanol, Simms (58) estableció que el modelo de IA2BC puede usarse para lograr que las ratas consuman etanol al 20% en niveles altos (5-6g/Kg/24h). Sin embargo, aproximadamente el 30% de las ratas llega al fenotipo alcohólico con concentraciones de alcohol en sangre (BEC) de entre 90-100 mg/dL, criterio que establece el Instituto Nacional de Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) para determinar el consumo excesivo de alcohol en humanos (58, 65). Por lo que, para obtener una muestra de 20 en el grupo experimental, se requiere una muestra de $n \sim 70$ del grupo control. Dado lo anterior, el número total de ratas requerido para el modelo general es de 90 (45 hembras, 45 machos; 20 controles; 70 experimentales). Para este trabajo de investigación, utilizaré los datos de comportamiento y neuroimagen derivados de este modelo general de AUD, así como la realización de inmunofluorescencia, en donde la muestra será de $n = 3$ por grupo.

Nos basamos en un modelo de Acceso Intermitente de Etanol de 2 Botellas a Elección (58) establecido previamente en el laboratorio (113, 114). Este modelo es de consumo crónico con duración de 30 sesiones. Se alojaron a las ratas en un cuarto con el ciclo invertido (7:00h a 19:00h). La posición de las botellas alcohol-agua fue realizada de manera aleatoria (80,83) para controlar las preferencias acorde a posicionamiento. El modelo de IA2B se estudió en ratas Wistar adolescentes (P45). Para describir el modelo de consumo intermitente a alcohol se calcularon las variables descritas por Simms (2008; 58):

- Consumo de alcohol a las 24 horas ponderado por peso de la rata (g/Kg/24h).
- Consumo total de líquidos alcohol/agua (mL/24h) y ponderado por peso (mL/Kg/24h). Se consideró que 100mL de EtOH al 20% corresponde a 96.1216g.

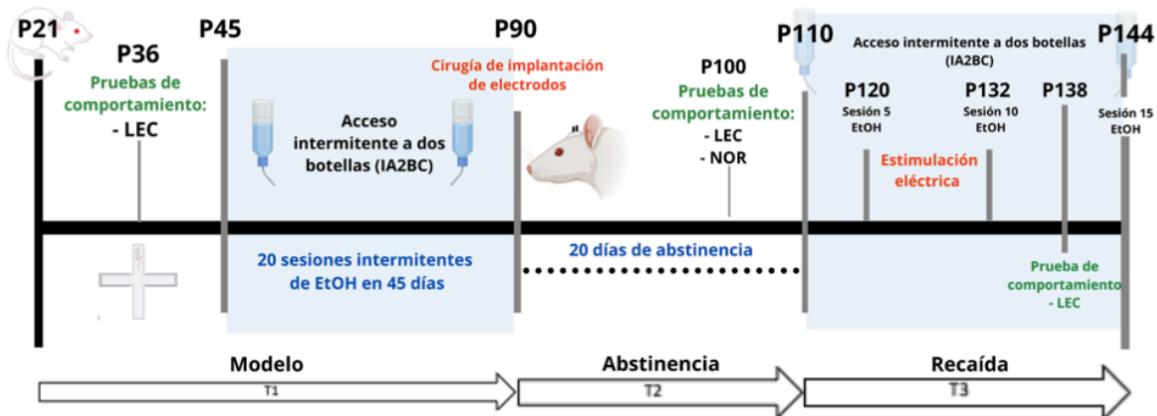


Figura 1: Modelo IA2B. El modelo en el que se basó para la adquisición de los datos fue el modelo de acceso intermitente a alcohol con dos botellas. En este modelo durante los días lunes, miércoles y viernes, se expuso a las ratas a dos botellas: alcohol y agua. Los restantes días estaban expuestas a dos botellas, pero ambas únicamente con agua. Cada día con exposición a alcohol y agua se considera como una sesión. Las ratas se expusieron a 20 sesiones, luego 20 días de abstinencia y posteriormente a otras 10 sesiones de exposición a alcohol.

Una vez establecido el modelo de alcoholismo, el siguiente paso es estudiar las alteraciones neurobiológicas que dan origen a este fenómeno. Una forma de aproximarnos a estas alteraciones es a través del estudio de cambios estructurales. Estos cambios pueden ser macro o microestructurales, por lo que se requiere diferentes técnicas para su análisis. En el presente proyecto, se empleó la técnica de resonancia magnética estructural con un análisis morfométrico basado en deformación para observar cambios volumétricos macroscópicos. Además, se utilizará la técnica de inmunofluorescencia indirecta para observar cambios microscópicos en el conteo celular de neuronas, astrocitos y microglía. Posteriormente, se realizará una regresión lineal para determinar si existe una relación entre los cambios volumétricos macroscópicos y la cantidad celular microscópica.

III.2) Imágenes Digitales como herramientas de estudio

Para los objetivos de esta tesis, se llevó a cabo un análisis de Imágenes de Resonancia Magnética (IRM) e Imágenes de Microscopía (IM), por lo que es importante comprender qué implica la digitalización de este tipo de imágenes, y cómo se pueden utilizar diferentes herramientas para su análisis. Abordaremos el concepto general de imágenes digitales y posteriormente exploraremos las técnicas de IRM e IM.

Matemáticamente, una imagen digital se puede expresar como una función de la intensidad de señal en 2D, (x,y) , donde x y y son coordenadas espaciales y el valor de la función en (x,y) es proporcional a que tan amplia en un punto dado (89). En el caso de las imágenes multispectrales, (x,y) es un vector, donde cada uno de sus componentes indica lo brillante de una imagen en determinado punto para la correspondiente banda espectral. Así pues, una imagen digital es un imagen (x,y) que ha sido discretizada en coordenadas espaciales y en brillo, en un arreglo 2D, en el que cada valor representa un nivel de gris (89). Cada elemento de esta matriz se le conoce como “pixel” (derivado de “picture element”). De esta manera, una imagen se puede expresar de la siguiente forma:

$$f(x,y) = \begin{bmatrix} f(1,1) & f(1,2) & \dots & f(1,N) \\ f(2,1) & f(2,2) & \dots & f(2,N) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f(N,1) & f(N,2) & \dots & f(N,N) \end{bmatrix}$$

Tomando en cuenta que $0 \leq (x,y) \leq G - 1$, donde N es el número de píxeles y G denota el valor máximo que cada pixel puede tomar. Ambos valores son expresados como potencias de 2 de números naturales ($N = 2^n$, $G = 2^m$) por conveniencia matemática. Visto de esta forma, en las imágenes el número de píxeles está determinado por el parámetro N y rango de valores de la escala de grises está determinado por el parámetro m (89).

El procesamiento de imágenes se realiza mediante transformaciones, las cuales se efectúan mediante operadores. Un operador toma una imagen como *input* y produce otra imagen como *output* (89). El objetivo del procesamiento de imágenes es facilitar la medición y análisis de imágenes al resaltar los componentes que se desean medir (88).

Estos principios se han utilizado en diferentes campos para generar imágenes a partir de diferentes propiedades. Las IRM son el resultado de la digitalización de imágenes a partir los átomos de hidrógeno aprovechando el fenómeno de resonancia magnética nuclear. Por otro lado, las IM dependen de las características del microscopio para captar la luz y transformar esa información en una imagen digital.

III.3) Adquisición de las imágenes de Resonancia Magnética y Microscopía

Después de haber completado las 35 sesiones del modelo de exposición al alcohol, se realizaron resonancias *in vivo* (P145) en las ratas, tanto en el grupo de control como en el grupo expuesto a alcohol. El objetivo de estas resonancias es identificar las áreas cerebrales que han experimentado cambios de volumen en las ratas expuestas a alcohol. Para lograr esto, se utilizó la técnica de morfometría basada en deformación (DBM). Una vez que se han adquirido las imágenes de resonancia magnética, se perfunde y crioprotegen los cerebros con el fin de conservarlos adecuadamente. Una vez obtenidas las áreas de interés a partir del análisis de DBM, localizamos anatómicamente estas regiones. A continuación, se adquieren cuatro rebanadas de cada una de las áreas de interés y se llevó a cabo el protocolo de inmunofluorescencia. Las imágenes se capturan mediante un microscopio confocal y posteriormente se realizaron los procesos de segmentación para realizar el conteo de los tres tipos celulares (neuronas, astrocitos, microglía) en las ROI

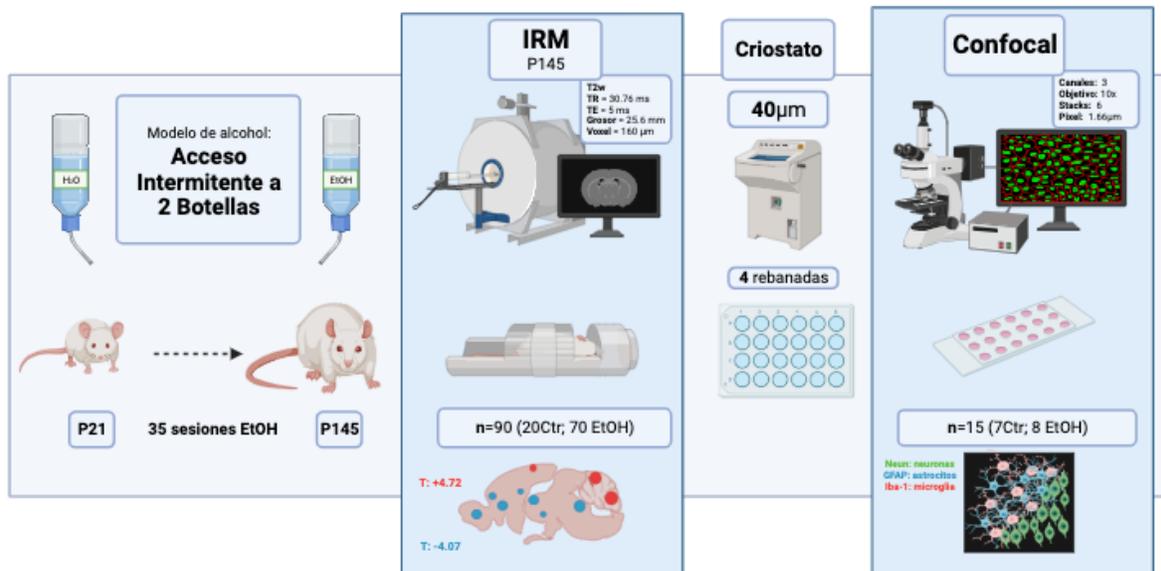


Figura 2: Diseño experimental. Después de la implementación del modelo de exposición al alcohol, se llevan a cabo resonancias *in vivo* en los animales sometidos al modelo IA2BC. A continuación, se procede con la perfusión, extracción y seccionamiento de los cerebros, con el propósito de realizar el proceso de inmunofluorescencia y su posterior observación bajo el microscopio confocal. Por último, se establece una relación entre los resultados obtenidos mediante las imágenes de Resonancia Magnética y los resultados de la Inmunofluorescencia por medio de una regresión lineal multivariable.

III.4) Adquisición de las imágenes por Resonancia Magnética

Las imágenes se adquirieron con un resonador Bruker Pharmascan 7T (Bruker Pharmascan 70/16US) usando una combinación de una bobina de radiofrecuencia circular de diámetro de 72mm para la transmisión de señales y una bobina de superficie de 2x2. El escáner se controló mediante el software Paravision 6.0.1. Se tomaron secuencias estructurales, de difusión y funcionales *in vivo* de los animales. Para la adquisición de imágenes *in vivo* se ocupó una secuencia 3D flash pesada a T2 con repeticiones que ocuparon los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) 30.76ms, tiempo de eco (TE) 5.0ms, voxel isométrico de 160µm, campo de visión (FOV) de 28.2×19×25.6mm. El Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) facilitó la adquisición de las imágenes en el presente estudio.

Se siguió una versión modificada del protocolo estipulado por Lerch (69) para el manejo de las imágenes de resonancia magnética:

1. **Preparación de la muestra:** las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital 20mg/Kg) vía intraperitoneal para crear un efecto anestésico y evitar el dolor de la cirugía siguiente. Se expone la cavidad torácica y se realiza una punción en ventrículo izquierdo en donde se perfunde PBS al 1 molar a razón de 10mL/min por 20 min (~200mL). Posteriormente, las ratas son perfundidas con una solución compuesta por paraformaldeído al 4% como fijador y Gadolinio para mejorar la resolución de las imágenes de resonancia a razón de 10mL/min por 20 min (~200mL). Siguiendo a la perfusión, el cráneo es disecado y colocado en una solución de postfijación compuesta por PFA al 4% a una temperatura de

4°C por 12h. Por último, los cráneos son pasados a una solución de PBS 1X + 0.02% de azida de sodio hasta el día en que serán adquiridas las imágenes.

2. **Adquisición de la imagen de resonancia:** las imágenes son adquiridas mediante una secuencia de pulsos que proveen un contraste apropiado para caracterizar el fenotipo, en nuestro caso se usó una secuencia FLASH pesada a T1 con adquisición de voxels isotrópicos para su posterior análisis.
3. **Preprocesamiento:** Una vez adquiridas las imágenes, deben revisarse para asegurarse de que no existan inhomogeneidades o artefactos que no permitan el correcto análisis de las imágenes. Asimismo, el formato del Bruker debe de ser transformado a formato Nifti con organización BIDS según convención.
4. **Procesamiento:** Las imágenes fueron alineadas dentro de las mismas coordenadas estereotáxicas establecidas por un atlas, lo que se logra creando una representación Gaussiana de las imágenes adquiridas y del atlas a comparar. Se remueven las inhomogeneidades usando el algoritmo N3 (69). Una vez llevadas al mismo espacio y orientación, el siguiente paso es crear el mejor modelo lineal de todos los cerebros contenidos en la base de datos. Posteriormente, es necesario afinar el registro de deformaciones locales para crear una correspondencia exacta entre regiones anatómicas. Esto se logra mediante un proceso iterativo de corrección. Subsiguientemente, se preparan los datos para su análisis estadístico creando un mapa paramétrico que define la forma del cerebro y sus regiones. Se eligieron 20,000 puntos del cerebro de manera azarosa para extraer sus coordenadas espaciales antes y después del muestreo no lineal. Se obtienen los 12 parámetros que mejor ajustan los datos y se sustrajeron de la transformada no lineal final, lo que resulta en un campo que contiene los componentes no lineales de cada registro (Figura 3). Estos campos no lineales son centrados con respecto a la población promedio y se obtienen los vectores de deformación de correspondencia con cada voxel. Esto resulta en dos métricas: el determinante Jacobiano (una medida de expansión y contracción de volumen) y la medida de deformación de cada voxel. El determinante Jacobiano se multiplica por los 12 parámetros registrados para obtener 2 mapas paramétricos de los campos deformados: 1) el determinante Jacobiano absoluto, el cual describe la diferencia local de volúmenes de todo el cerebro; 2) el determinante Jacobiano relativo, el cual describe el cambio del volumen local y la diferencia de tamaños en cada voxel, tomando en cuenta las diferencias intersujeto. Se alinearon con un atlas que divide al cerebro en 62 regiones (114 si son bilaterales) en un estudio no lineal de una población específica.
5. **Análisis estadístico:** el pipeline descrito en la parte anterior da como resultado: a) una tabla con el volumen de las estructuras anatómicas; b) medidas de expansión y contracción local de cada voxel; c) los vectores de deformación de cada voxel; d) los datos asociados a los espacios promedios no lineales. Ver más en la sección de análisis de datos.

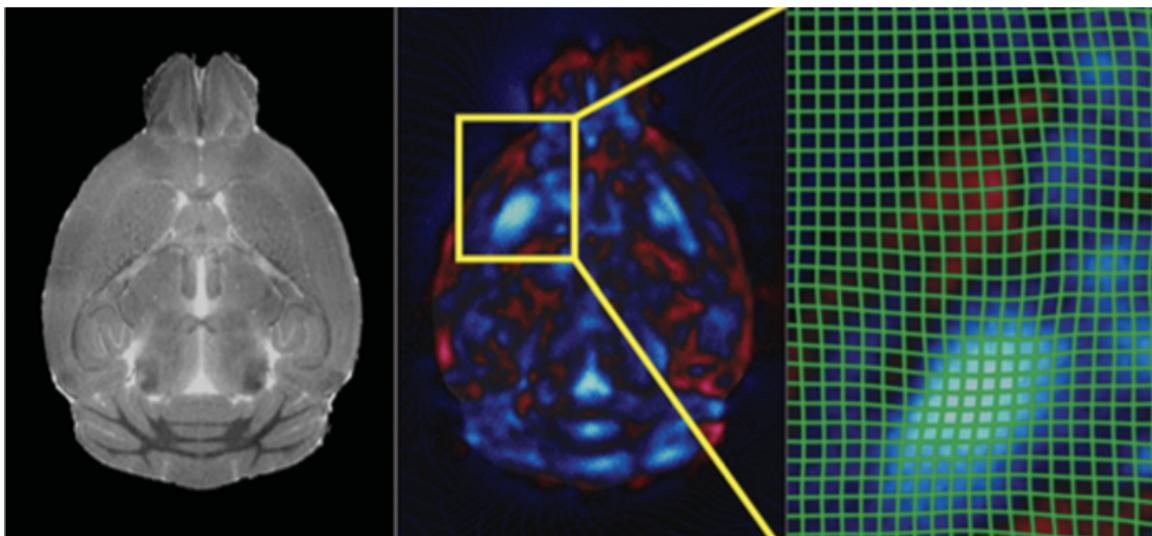


Figura 3: Análisis de morfometría basado en deformación (DBM). Una vez completado el proceso de adquisición y preprocesamiento, se lleva a cabo el análisis de DBM. Este análisis identifica las áreas que muestran incrementos o decrementos en los volúmenes locales. La imagen presentada ejemplifica cómo ciertas regiones se deben deformar en correspondencia con voxels específicos para lograr una concordancia con el template. Adaptada de Lerch, 2019.

III.5) Seccionamiento e Inmunofluorescencia

Basados en los resultados de la DBM, se eligieron como regiones de interés (ROI) las regiones que sobrevivieron a la corrección de FDR al 5%. Guiados por el atlas estereotáxico de Paxinos (85), encontraremos el corte coronal correspondiente a dicha ROI y se obtuvieron un total de 3 cortes de cada ROI.

Usando un criostato modelo 3050S se hicieron cortes coronales de $40\mu\text{m}$, en las zonas indicadas. Los cortes fueron sumergidos en solución tampón fosfato salina (PBS) a temperatura ambiente por 1 hora y bloqueadas con solución de bloqueo (suero de albumina bovina (BSA) al 5%, TritonX-100 al 0.1%) por 2h a temperatura ambiente. Posterior a eso, las muestras fueron incubadas por 48h a 4°C con los anticuerpos primarios contra neuronas (Mouse anti-NeuN, 1:1000), astrocitos (Rabbit anti-GFAP, 1:1000), y microglía (Rat anti-Iba-1, 1:1000). Una vez cumplido el tiempo, se incubaron los anticuerpos secundarios específicos alexa 488 (anti-mouse, 1:1000), 555 (anti-rat, 1:1000), y 647 (anti-rabbit, 1:1000) por 4h a temperatura ambiente en un cuarto oscuro. Los tejidos fueron montados en un portaobjetos con solución de montaje ProLong® Diamond Antifade Mountant con DAPI para teñir núcleos y guardados en un cuarto a temperatura 4°C en condiciones de oscuridad. El protocolo completo se encuentra en el Anexo II y la teoría sobre el análisis de imágenes y selección del microscopio en el Anexo III.

Los experimentos control de inmunofluorescencia consistieron en omitir el anticuerpo primario e incubar el tejido solo con el anticuerpo secundario.

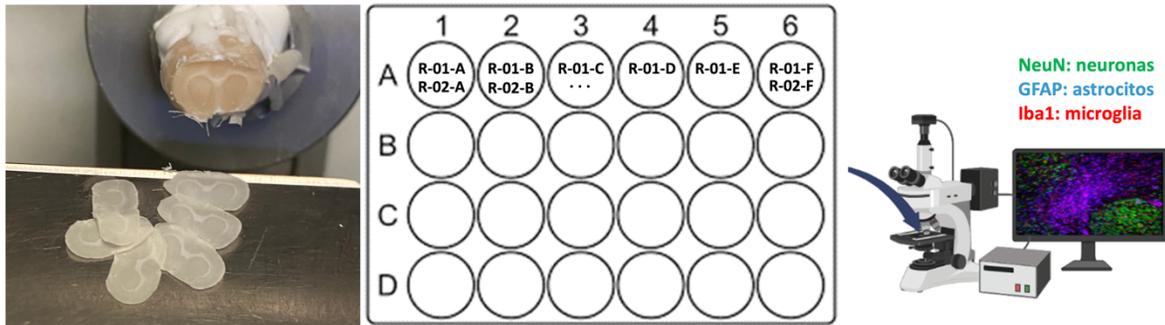


Figura 4: Seccionamiento e Inmunofluorescencia. Con un criostato, se obtuvieron rebanadas de 40 μ m. Se depositaron las rebanadas en una caja de microcanastillas para realizar el protocolo de inmunofluorescencia por flotación. Se colocaron las rebanadas en orden secuencial (A-F) para conocer cuál región es más anterior o posterior. Posteriormente, se adquirieron las imágenes con un microscopio ZEISS LSM780 confocal. Detalles del protocolo en el Anexo I.

III.6) Adquisición de las imágenes de Microscopía

Para determinar el tipo de microscopio y objetivo más adecuados a utilizar, se realizó un experimento detallado en donde se tomaron en cuenta dos tipos de microscopios de fluorescencia (campo amplio y confocal) y se compararon métodos de procesamiento de sus imágenes (Anexo II). Tras evaluar los resultados del experimento de selección de microscopio para la automatización de la tarea, se optó por utilizar el microscopio Confocal LSM-780. Se tomaron fotos en aumento 10x; tile 4x1; 6 z-stacks; 3 canales delimitados los láseres a 499-522nm (verde: NeuN); 566-577nm (rojo: Iba-1); 649-680nm (azul: GFAP). Se ajustó el eje para capturar el PCM.

Para la adquisición se utilizó el software Zen y se realizó proyección máxima. Este sistema fue elegido para llevar a cabo el análisis automatizado de conteo celular en las regiones de interés identificadas mediante el análisis de DBM, con el propósito de discernir las diferencias en el conteo celular entre las ratas de control y las que consumieron alcohol. La Unidad de Microscopía del INB puso a nuestra disposición las instalaciones y el equipo necesario para realizar estos procedimientos.

Análisis de Datos

III.7) Preprocesamiento de las imágenes de Resonancia Magnética

Las secuencia estructural se convirtió de formato Bruker a formato Nifti mediante brkraw (<https://brkraw.github.io/>). Posteriormente, el preprocesamiento de las imágenes se llevó a cabo de la siguiente forma: corrección de señal, corrección de inhomogeneidades y corrección de registro con el atlas de Fisher 344, usando las herramientas MINC-toolkit-v2 (<https://github.com/BIC-MNI/minc-toolkit-v2>), ANTs V3.0 (<http://stnava.github.io/ANTs/>) y Mrtrix V3.0 (<https://www.mrtrix.org/>).

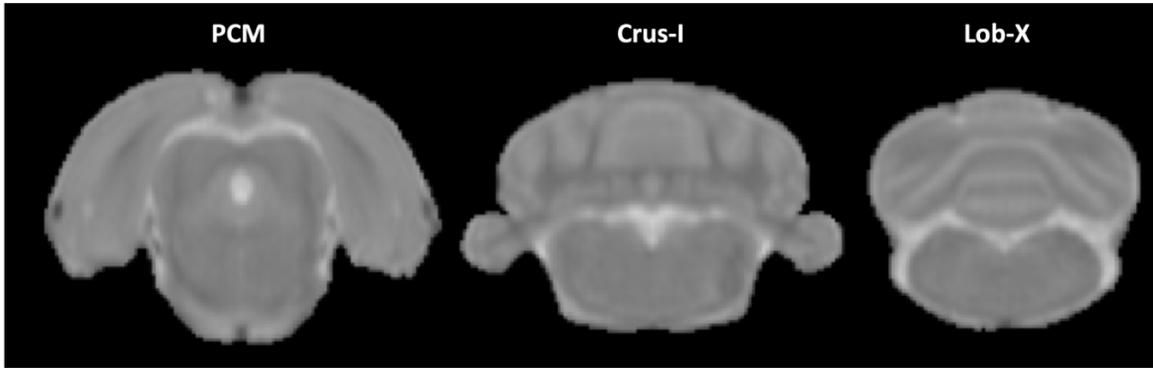


Figura 5: Preprocesamiento de Imágenes de Resonancia Magnética. Una vez adquiridas las imágenes en el Bruker, se realiza un preprocesamiento que consiste en: cambio de formato a Nifti, extracción de cráneo, corrección de inhomogeneidades y corrección con el template.

III.8) Morfometría Basada en Deformación

Para nuestro estudio, el análisis de Morfometría Basada en Deformación se obtuvo de https://github.com/CoBrALab/twolevel_ants_dbm, el cual se basa en ANTsX/ANTs v2.3.15. De este análisis se obtiene un mapa de jacobianos en donde se cuantifican las deformaciones locales de las regiones cerebrales específicas que se ajustaron al template de los sujetos controles y experimentales. Para este análisis se utilizó la parcelación del atlas de Fisher 344.

Una vez obtenidos los mapas de los jacobianos, se evaluaron los cambios morfométricos de deformación al compararse los sujetos experimentales y los sujetos controles contra el atlas de Fisher 344 mediante un modelo lineal de efectos mixtos utilizando el paquete “RMINC” del lenguaje de programación R (<http://mouse-imaging-centre.github.io/RMINC>). Se consideró un efecto de interacción entre el grupo (control vs alcohol) y la última sesión adquirida in vivo, como covariable se añadió la camada y se agregó un efecto aleatorio (1|ID). Los análisis fueron corregidos por múltiples comparaciones mediante FDR (*false discovery rate*).

$$\text{Jacobiano} \sim \text{Grupo} + \text{Sex} + \text{Batch} + (1 | \text{RID})$$

III.9) Análisis de las imágenes de Microscopía

En nuestro proyecto de investigación, se adquirieron imágenes usando el microscopio ZEISS Leica LSM780, objetivo 10x, 06 stacks, mediante el software ZEISS, se les realizó *maximum projection* para concatenar la información de las 40 micras en los diferentes stacks en imágenes bidimensionales. Posteriormente, se les aplicó el método de umbral de binarización mediante el software ImageJ para distinguir los objetos del fondo. Se segmentaron las imágenes mediante el método regional *watershed* para marcar las separaciones entre aquellas células que se encuentren solapadas. Y, por último, se empleará *analyze particle* para realizar

el conteo automatizado. Estas herramientas se encuentran en el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

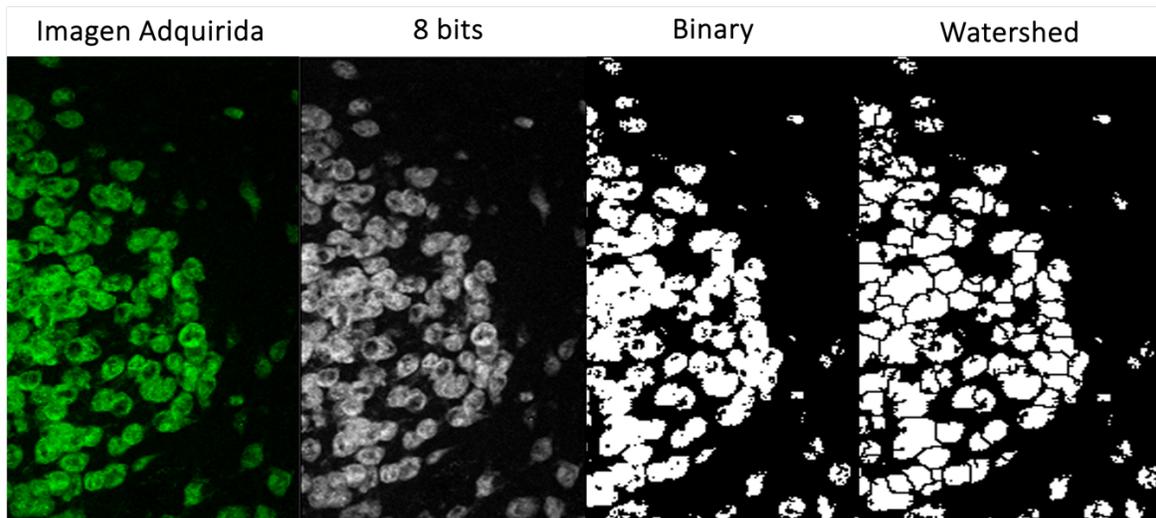


Figura 6: Procesamiento de imágenes de Microscopía para conteo automatizado. Una vez adquirida la imagen, se convierte a formato 8 bits, se binariza para diferencia background the foreground y se segmenta por método de watershed

III.10) Regresión Lineal

Se empleó una regresión lineal múltiple para observar qué tanto de la varianza de los mapas de jacobianos, la deformación, era explicada por los diferentes tipos celulares. Se utilizó el conteo celular de células marcadas con NeuN, GFAP e Iba1 de 4 cortes en cada región de interés y se comparó contra el jacobiano obtenido por el análisis de deformación de la misma rata a la que se le realizó el conteo celular.

$$\mathbf{Jacobiano} = \beta_0 + [\beta_1(\text{conteo NeuN}) + \beta_2(\text{conteo GFAP}) + \beta_3(\text{conteo Iba-1})] * (\text{grupo}_{\text{EtOH}}) + \epsilon$$

Se tomó como covariables el conteo celular de cada tipo celular (neuronas, astrocitos y microglia) y su interacción con respecto al grupo.

Capítulo IV Resultados

IV.1) Resultados del Análisis de Morfometría Basada en Deformación

La Figura 7 y la Tabla 4 presentan las áreas locales en las regiones cerebrales que exhibieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de DBM. El resultado de la comparación de voxel por voxel fue ajustado mediante el método tasa de falsos descubrimientos (*False Discovery Rate*, FDR; $t=2.48$: 15%). Resultó en una disminución en los volúmenes locales en el Bulbo Olfatorio, el Núcleo Accumbens (shell y core), el Caudado-Putamen, el Área Tegmental Ventral y el Pedúnculo Cerebeloso Medio. La reducción más pronunciada en el volumen local se identificó en el Caudado-Putamen (-4.07) y el Pedúnculo Cerebeloso Medio (-4.06). Además, resultó en un incremento en el volumen local en la Corteza Retrosplenial y los Lóbulos VIII-X del Cerebelo, así como en la región Crus-I. El mayor aumento en el volumen local fue en las áreas cerebelosas: Crus-I (3.56) y Lóbulos VIII-X (4.80).

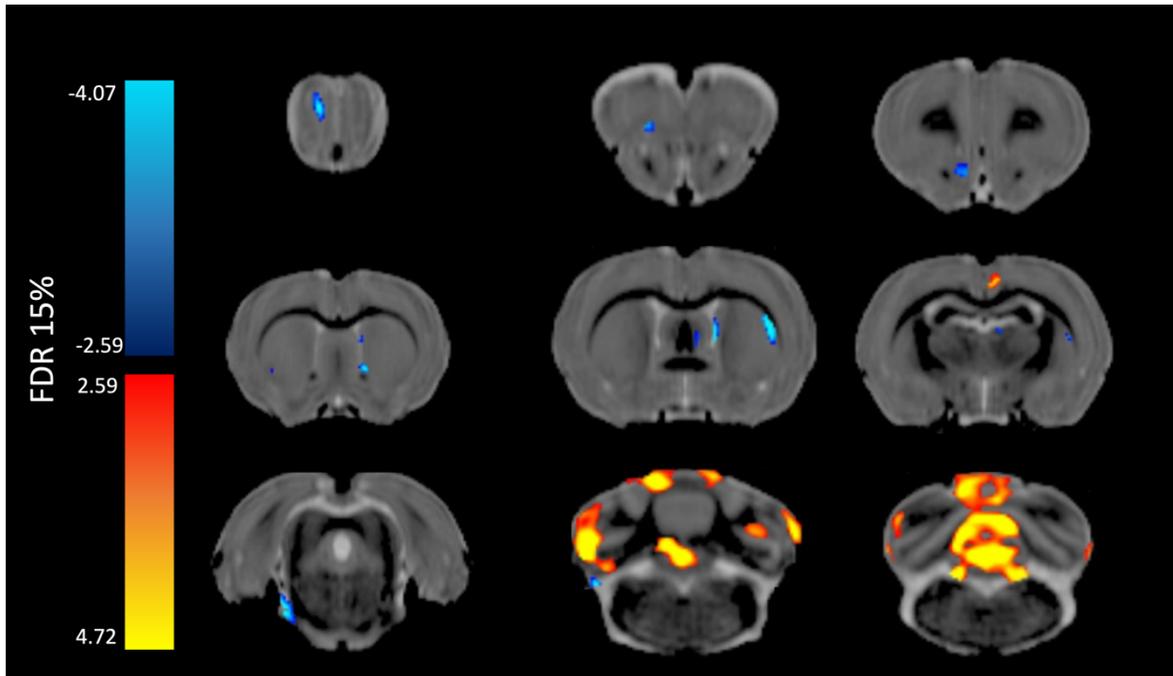


Figura 7 Mapa paramétrico del valor t . Se muestran los resultados del análisis de DBM. Se muestra decremento en las regiones de bulbo olfatorio, comisura anterior, núcleo accumbens shell, núcleo accumbens core, caudado-putamen y pedúnculo cerebeloso medio. Se muestra incremento de volumen en corteza retrosplenial, y Crus-I y Lob-X del cerebelo. Corrección de FDR al 15% ($t=2.59$) con fines ilustrativos. Para el estudio histológico, se seleccionaron las ROI que sobrevivieron al FDR al 5% ($t=3.48$).

Tabla 4. Resultados del Análisis de Morfometría basada en Deformación con FDR						
N°	Regiones del Atlas Sigma	Región en el Atlas de Paxinos	Lado	Coordenadas (x,y,z)	Efecto	Valor t
1	Capa Glomerular del Bulbo olfatorio	Bulbo Olfatorio: Capa Glomerular Acc, Capa externa Plexiforma (6.60mm)	Izquierdo	-0.88, 7.84, 3.28	Decremento	-3.48
2	Parte anterior de la comisura anterior	Shell del Núcleo Acumbens, Núcleo Olfatorio Anterior (parte posterior), Corteza Orbital ventral (3.20mm)	Izquierdo	-1.19, 3.04, -0.01	Decremento	-2.94
3	Estriado	Accumbens core (1.68mm)	Derecha	1.96, 1.39, 0.28	Decremento	-3.30
4	Estriado	Caudate-Putamen (-0.36)	Derecho	4.81, -0.25, 2.23	Decremento	-4.07
5	Corteza Retroesplénica Granular	Retroesplénica (-2.76)	Derecho	0.01, -5.81, 5.83	Incremento	2.64
6	Sustancia Negra	Area Tegmental ventral (-4.80mm)	Derecho	2.86, -6.71, -0.16	Decremento	-3.08
7	Pedúnculo Cerebeloso Medio	Pedúnculo Cerebeloso Medio (-7.92mm)	Izquierdo	-3.44, -7.61, -1.66	Decremento	-4.06
8	Capa molecular del Cerebelo	Crus 1 (-11.28mm)	Izquierdo	-5.84, -11.21, 1.78	Incremento	3.56
9	Capa Granular del Cerebelo	Lobulo VIII-X del Cerebelo (-12.72mm)	Centro	0.01, -13.31, 1.18	Incremento	4.80

Tabla 4 Resultados del análisis de Morfometría basada en Deformación. En esta tabla se presentan los resultados obtenidos del análisis de DBM. Se enlistan las regiones cerebrales en orden de anterior a posterior, junto con la región correspondiente según el atlas de Sigma. Posteriormente, se procedió a determinar la ubicación precisa en altura del cambio de volumen local. Para ello, se consultó el atlas de Paxinos, donde se ubicó la altura específica para cada región con cambio de volumen, permitiendo su posterior seccionamiento y análisis histológico. Los valores "t" de cada Región de Interés (ROI) obtenida mediante el análisis de DBM se presentan en la tabla, teniendo en cuenta los diferentes grupos de estudio y género (n= 90; 45H, 45M; 20Ctr, 70EtOH). FDR al 15% (2.48: amarillo); 10% (2.79: anaranjado); 5% (3.33: rojo)

IV.2) Resultados de la exploración del correlato histológico de las alteraciones en los volúmenes locales obtenidos a través del análisis de DBM.

Una vez identificadas las regiones cerebrales con cambios en los volúmenes, se procedió a determinar la ubicación específica de los picos de deformación. Se aplicaron umbrales de FDR del 5% (t=3.48), 10% (2.93) y 15% (2.59) para estimar la ubicación de los picos de deformación y la extensión de las diferencias en los volúmenes locales (Tabla 4). Para correlacionar la altura de la deformación con la región histológica correspondiente, se utilizó el Atlas de Paxinos.

Una vez que se determinó la ubicación precisa de las ROIs identificadas por DBM en el Atlas de Paxinos, se procedió a examinar los cambios histológicos correspondientes (Figura 8). Se observa que las áreas que muestran una reducción en el volumen local según los resultados de DBM están asociadas con la presencia de gliosis y/o cicatriz glial. Por otro lado, en las áreas que presentan un aumento en el volumen local según DBM, se nota una mayor presencia de células marcadas con GFAP e Iba1, distribuidas de manera más dispersa.

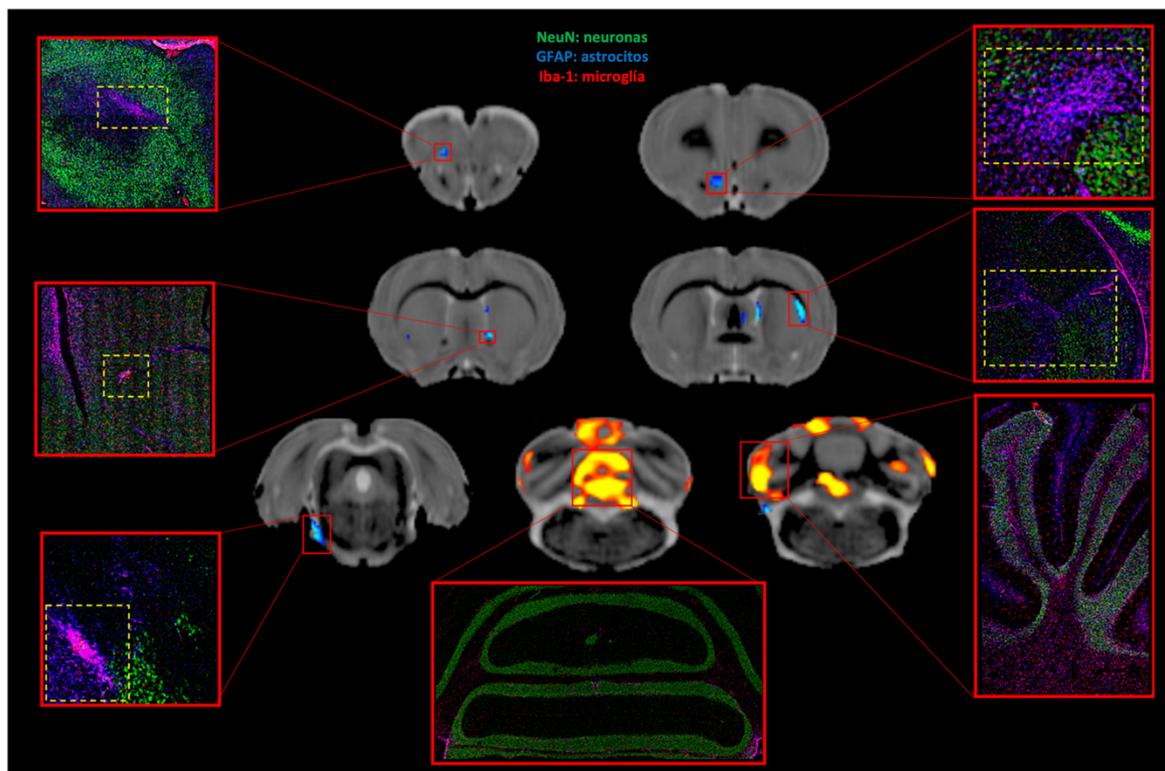


Figura 8: Hallazgos histológicos de 7 ROIs identificadas por el análisis de DBM. En esta figura se presentan los hallazgos histológicos de las 7 Regiones de Interés (ROIs) identificadas mediante el análisis de DBM. Se observa que las áreas con un menor volumen local corresponden a áreas de gliosis (señaladas con un recuadro amarillo punteado). Por otro lado, las áreas con un aumento en el volumen local muestran un incremento en la presencia de células marcadas con GFAP e Iba-1, distribuidas de manera difusa. (Azul: GFAP para Astrocitos; Rojo: Iba-1 para microglía; Verde: NeuN para neuronas)

IV.3 Cambios macroscópicos en PCM, Crus I y Lóbulo X

Para investigar la relación entre los cambios a nivel macroscópico y microscópico, se optó por concentrarnos en las regiones que presentaron las mayores diferencias según el análisis de DBM. Se seleccionaron áreas específicas que abarcaran tanto regiones con disminución del volumen local, como el Pedúnculo Cerebeloso Medio (PCM) con un valor t de -4.06 , así como dos regiones en el cerebelo con aumento del volumen local: Crus-I con un valor t de 3.56 y Lobulo X (Lob X) con un valor t de 4.80 . Estas regiones fueron elegidas para continuar su estudio mediante análisis histológicos. Para este estudio, se escogieron ratas de ambos sexos en ambos grupos: los controles (hembras: 03, 23, 47; machos: 37, 46, 49, 87) y los

experimentales (hembras: 04, 06, 07, 24, 35; machos: 43, 51, 85). Se buscó garantizar un tamaño de muestra de 3 a 4 ratas para cada región sometida a análisis histológico. Los picos de deformación específicos de las ROI de las ratas seleccionadas para el estudio histológico se extrajeron (ver Tabla 5 y Figura 9). Se consideraron los picos de deformación máximos obtenidos del análisis de DBM en el conjunto total de ratas sometidas a resonancia magnética (n=90: Ctr=20; EtOH=70). Utilizando estas coordenadas, se determinaron los picos máximos de deformación para las ratas seleccionadas para el estudio histológico, con el propósito de llevar a cabo un análisis de regresión individualizado para cada rata.

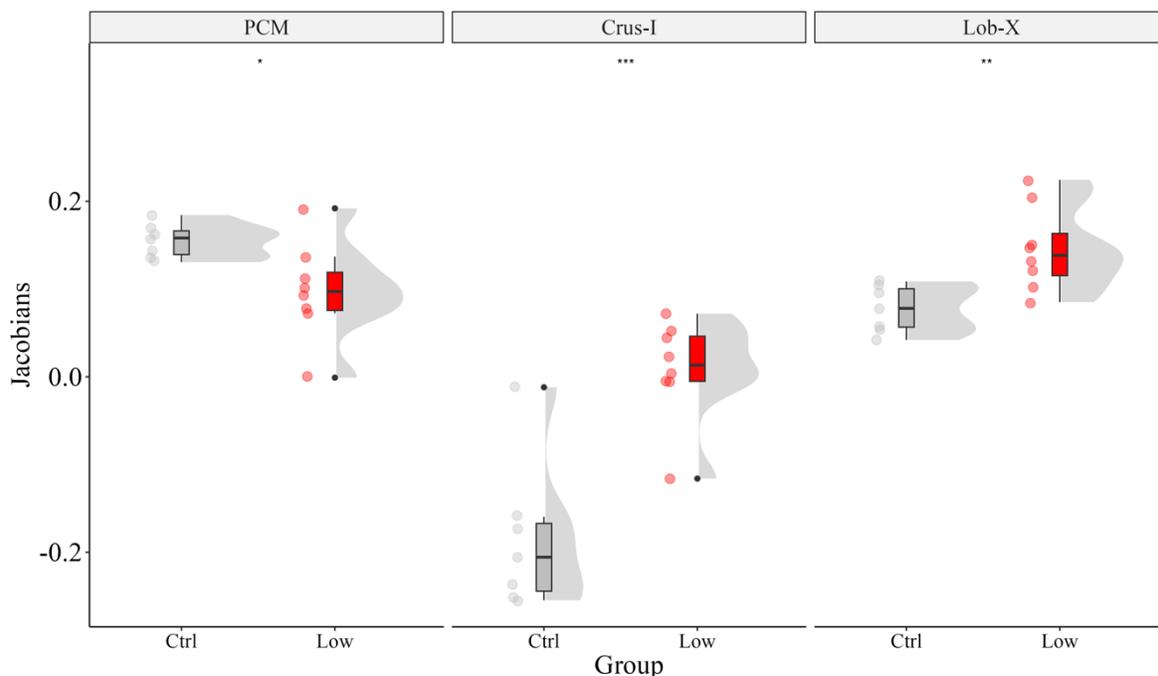


Figura 9: Distribución de los volúmenes de las ROI seleccionadas en la muestra para el estudio histológico. Se determinaron las coordenadas específicas de las ROI (PCM, Crus-I, Lob-X) a partir de los picos máximos de deformación estimados mediante los valores t obtenidos en el análisis de DBM (n=90; Ctr=20; EtOH=70). Estas coordenadas se trazaron en las ratas elegidas para el análisis histológico (n=15: Ctr=7; EtOH=8), permitiendo visualizar su distribución en la muestra seleccionada (n=15).

IV.4) Resultados de la comparación histológica en PCM, Crus-I y LobX

Comparación histológica en PCM

En la Figura 10 se muestran imágenes representativas del PCM en cerebros de ratas control y experimentales. En las ratas del grupo control, se observa una predominancia de células marcadas con GFAP en el PCM. En contraste, en las ratas del grupo experimental se aprecia una superposición de las señales en los canales azul y rojo, correspondientes a GFAP e Iba-1 respectivamente, debido a la coincidencia entre células marcadas con estas proteínas. Adicionalmente, se identifica una cicatriz glial (delimitada por un recuadro amarillo

punteado), evidenciada por la acumulación de células marcadas con GFAP e Iba-1. Esta cicatriz glial se localiza en la intersección entre los núcleos pontinos y el PCM.

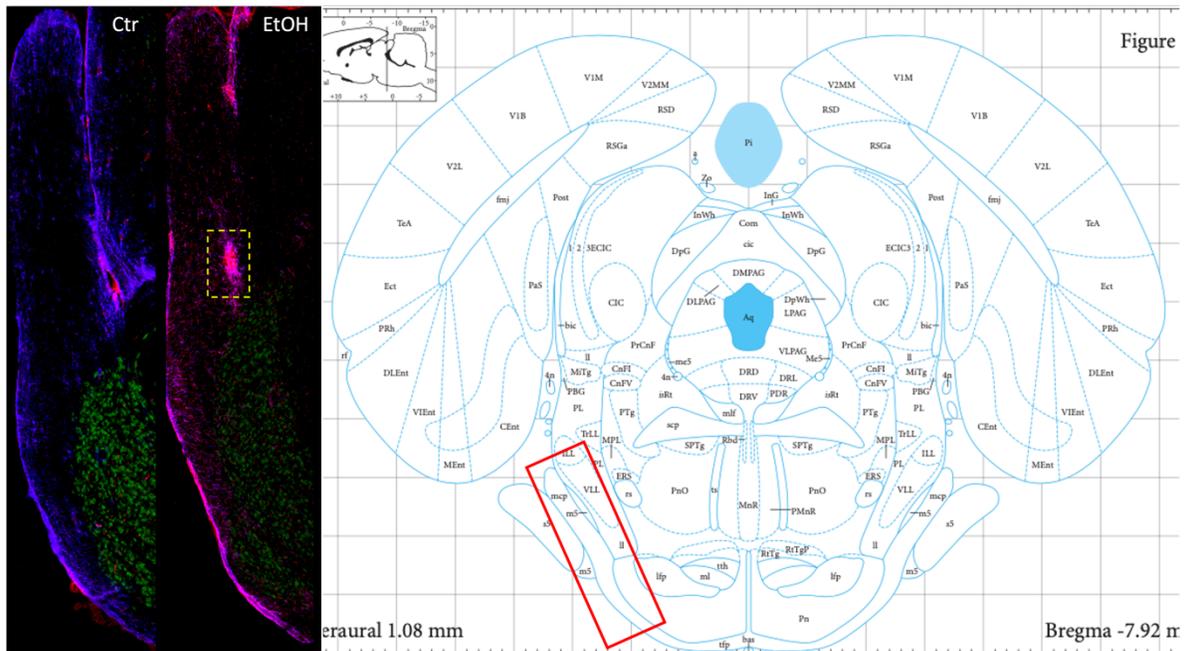


Figura 10: Comparación histológica del Pedúnculo Cerebeloso Medio (PCM) entre los grupos control (Ctr) y expuestos a alcohol (EtOH). Las células marcadas con NeuN, representadas en verde, corresponden a los núcleos pontinos. En la región del PCM, las ratas del grupo control muestran células marcadas con GFAP, mientras que en las ratas del grupo experimental se observa una superposición de señales de GFAP e Iba-1. Además, se identifica una cicatriz glial en los cerebros experimentales, delimitada por un recuadro amarillo punteado.

Comparación histológica en Crus-I

En la Figura 11, se muestran imágenes representativas de Crus-I en cerebros de ratas control y experimentales. Las células marcadas con NeuN muestran la capa granular del cerebelo. En las ratas del grupo control, las células marcadas con GFAP e Iba-1 están confinadas en la región correspondiente a las fibras musgosas y trepadoras (aférentes) del cerebelo. Por otro lado, en las ratas del grupo experimental, se observa que las células marcadas con GFAP e Iba-1 ya no se encuentran restringidas en la región de sustancia blanca aférente, sino que se dispersan por toda la región, infiltrándose en las capas granular y molecular de la región Crus-I. Notablemente, se encuentran concentradas principalmente cerca de un vaso sanguíneo (marcado por un recuadro amarillo punteado), donde se evidencia la acumulación de células marcadas con GFAP e Iba-1.

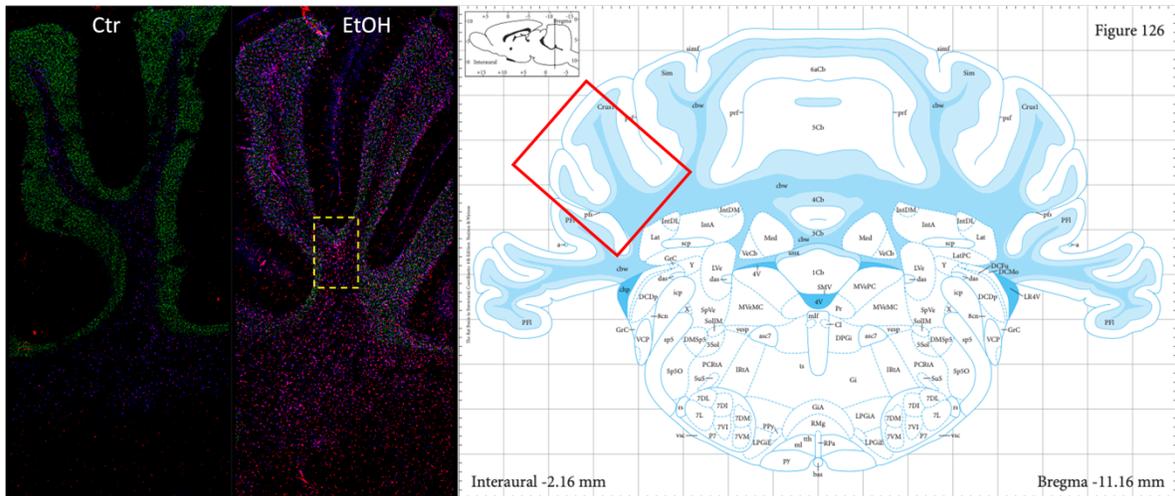


Figura 11: Comparación histológica en Crus-I del Cerebelo entre los grupos control (Ctr) y expuestos a alcohol (EtOH). Las células marcadas con NeuN, representadas en verde, corresponden a la capa granular. En la región de las fibras musgosas y trepadoras (aférentes) las ratas del grupo control muestran células marcadas con GFAP y poco Iba-1, mientras que en las ratas del grupo experimental se observa un aumento de la señal de Iba-1.

Comparación histológica en Lóbulo X del Cerebelo

En la Figura 12 se muestran imágenes representativas del Lóbulo X de cerebros de ratas control y experimentales. Las células marcadas con NeuN señalan la capa granular del Lobulo X y IX del cerebelo. En las ratas del grupo control, las células marcadas con GFAP e Iba-1 se localizan exclusivamente en la región correspondiente a la sustancia gris. En contraste, en las ratas del grupo experimental, se observa que las células marcadas con GFAP e Iba-1 ya no se restringen a la región de sustancia gris, sino que se infiltran en la sustancia blanca circundante.

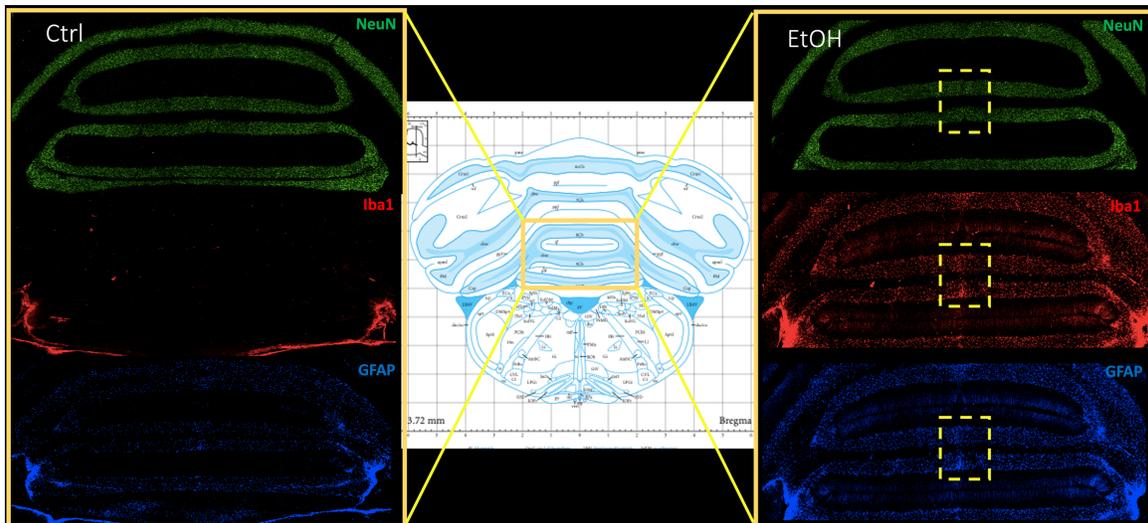


Figura 12: Comparación histológica del Lóbulo X del Cerebelo entre grupos de ratas control y experimentales. Las células marcadas con NeuN se presentan en verde, correspondiendo a la capa granular de los Lóbulos X y XI del cerebelo. En las ratas del grupo control, se observa que los astrocitos (marcados con GFAP) están restringidos a la sustancia gris, sin una presencia notoria de microglía (marcada con Iba-1). En contraste, en las ratas expuestas a alcohol, se aprecia un aumento en la cantidad de células marcadas con GFAP e Iba-1, además de una infiltración de estas células en las regiones de sustancia blanca. En el recuadro amarillo se evidencia una discontinuidad en las neuronas y una exacerbación de la gliosis.

IV.5) Conteo Celular en PCM, Crus-I y LobX

Luego, se procedió a llevar a cabo el conteo de nuestras tres marcadores: NeuN, GFAP e Iba-1 en cada una de las ROIs seleccionadas.

Conteo Celular en PCM

El análisis de conteo celular en la región PCM no revela diferencias significativas en el número de células marcadas con GFAP (Ctr=349.17; EtOH=251) ni NeuN (Ctr=410.35, EtOH=321.47). Sin embargo, se observan diferencias altamente significativas ($p<0.01$) en el conteo de células marcadas con Iba-1 (Ctr=162.35; EtOH=404.58).

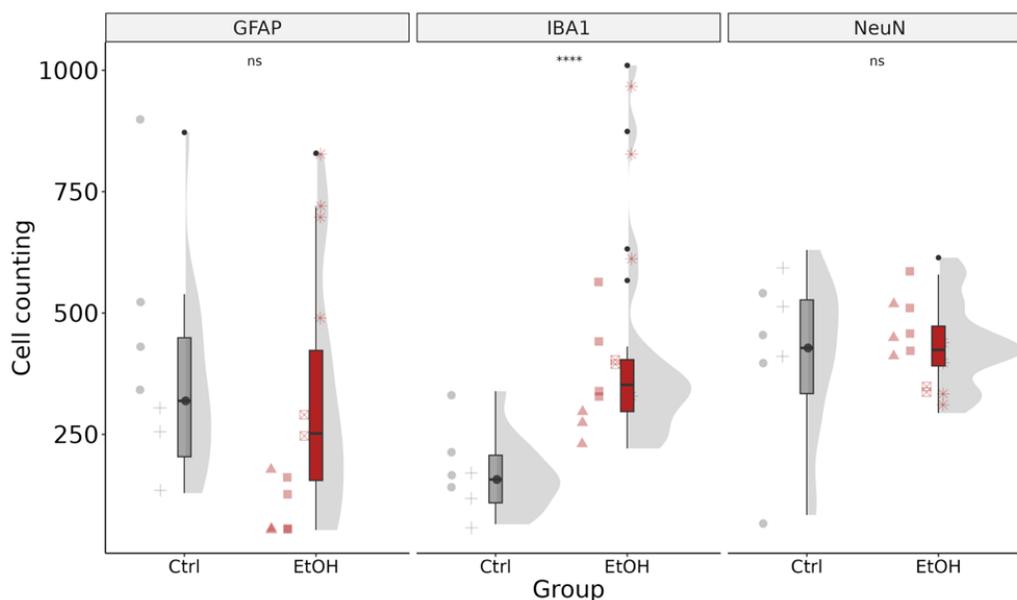


Figura 13: Boxplot del conteo celular en el Pedúnculo Cerebeloso Medio (Izquierdo). Cada figura geométrica representa una rata específica. Se destaca que la rata identificada con "*" muestra un mayor conteo de GFAP e Iba-1 pero no de NeuN en todas sus rebanadas.

Conteo Celular en Crus-I

El análisis de conteo celular en Crus-I no revela diferencias significativas en el número de células marcadas con NeuN (Ctr=1559.35, EtOH=1935.88), sin embargo, muestra diferencias significativas ($p<0.05$) en las células marcadas con GFAP (Ctr=600.14; EtOH=1,337.58) e Iba-1 (Ctr=187.53; EtOH=1,037.58).

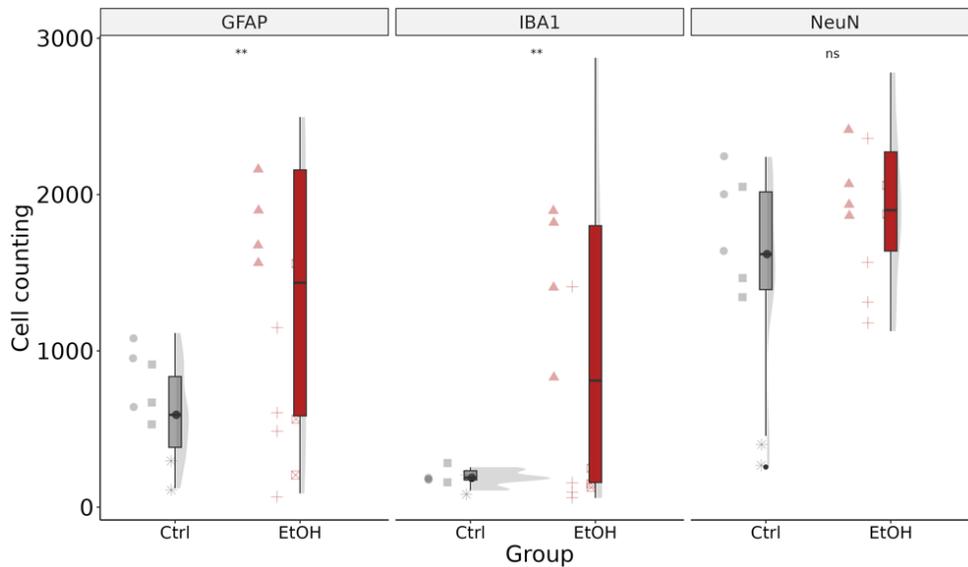


Figura 14: Representación gráfica del conteo celular en Crus-I (Izquierdo). Cada forma geométrica corresponde a una rata específica. Se destaca que la rata identificada con “Δ” muestra un mayor conteo de GFAP e Iba-1 pero no de NeuN en todas sus rebanadas.

Conteo Celular en Lob-X

El análisis de conteo celular en LobX no muestra diferencias significativas en el conteo de células NeuN (Ctr=2,012.08, EtOH=2,625), sin embargo, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en las células marcadas con GFAP (Ctr=660.22; EtOH=1,120.660) e Iba-1 (Ctr=165.81; EtOH=1,000)

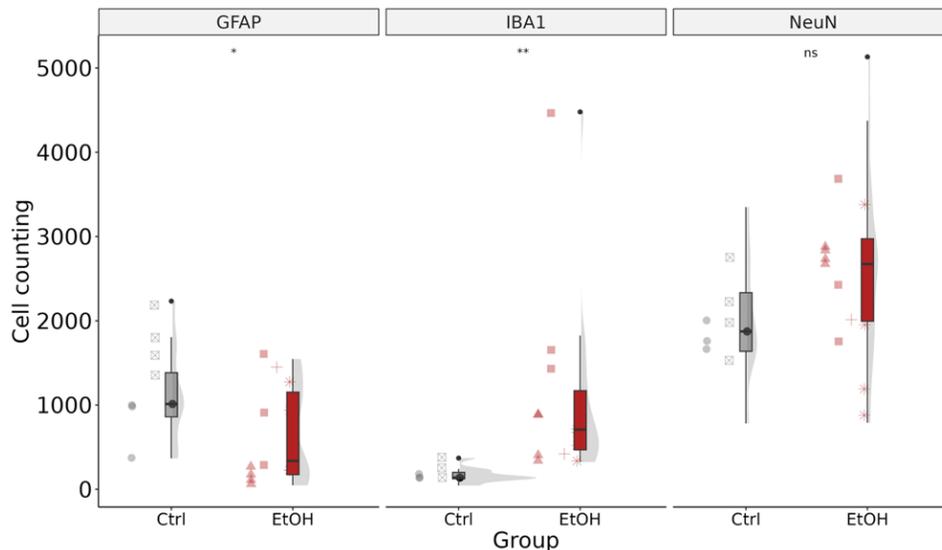


Figura 15: Representación gráfica del conteo celular en el Lóbulo X del Cerebelo. Cada figura geométrica representa una rata en específico. Se destaca que la rata identificada con “■” muestra un mayor conteo de GFAP e Iba-1 pero no de NeuN en todas sus rebanadas.

IV.6) Regresión Lineal Múltiple entre cambios Macroscópicos y Microscópicos

Una vez obtenidos los jacobianos (que representan los volúmenes) y el conteo celular de cada región, se procedió a realizar un análisis de regresión lineal múltiple. En este análisis, se consideraron los diferentes tipos celulares (neuronas, astrocitos y microglía) como covariables, tomando en cuenta su interacción con el grupo de estudio (control y etanol). El objetivo de este análisis fue determinar en qué medida el número de células tenía un efecto explicativo sobre las diferencias en los volúmenes observados.

En la región del PCM se obtuvo una R^2 ajustada de 0.96 y una p en conjunto de 0.13, siendo el conteo neuronal la covariable que mejor explica la variable respuesta ($p < 0.05$; Figura 16)

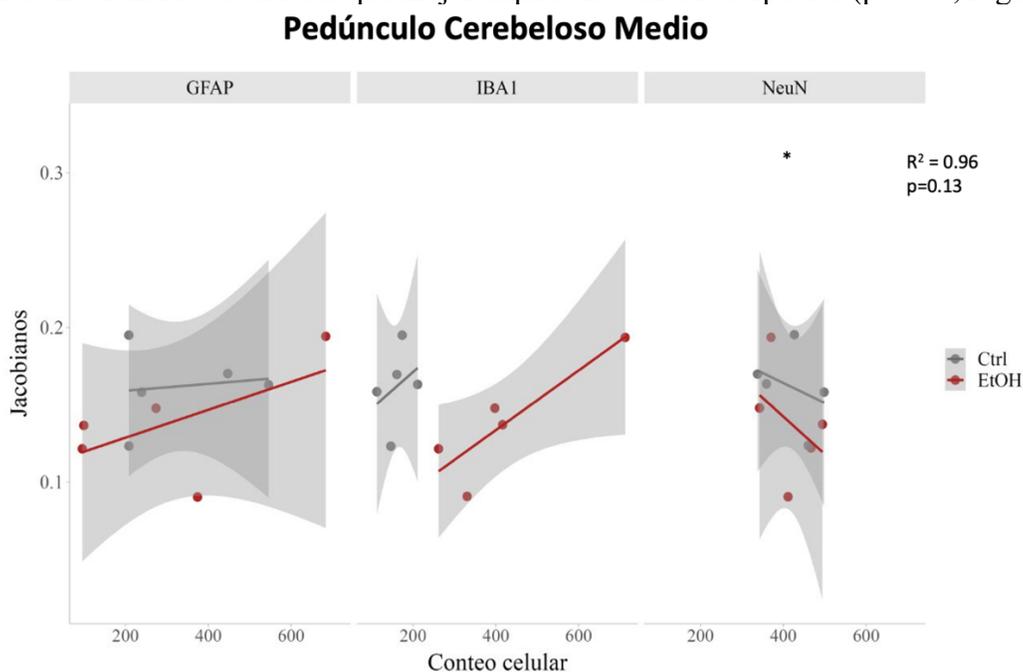


Figura 16: Análisis de Regresión Lineal en Pedúnculo Cerebeloso Medio. Coeficiente de Determinación Ajustado (R^2 ajustado) = 0.96; Valor de probabilidad (p) = 0.13.

En la región de Crus-I del cerebelo se obtuvo una R^2 ajustada de 0.99 y una p en conjunto menor que 0.01, siendo el conteo de microglía la covariable que mejor explica la variable respuesta ($p < 0.001$; Figura 17).

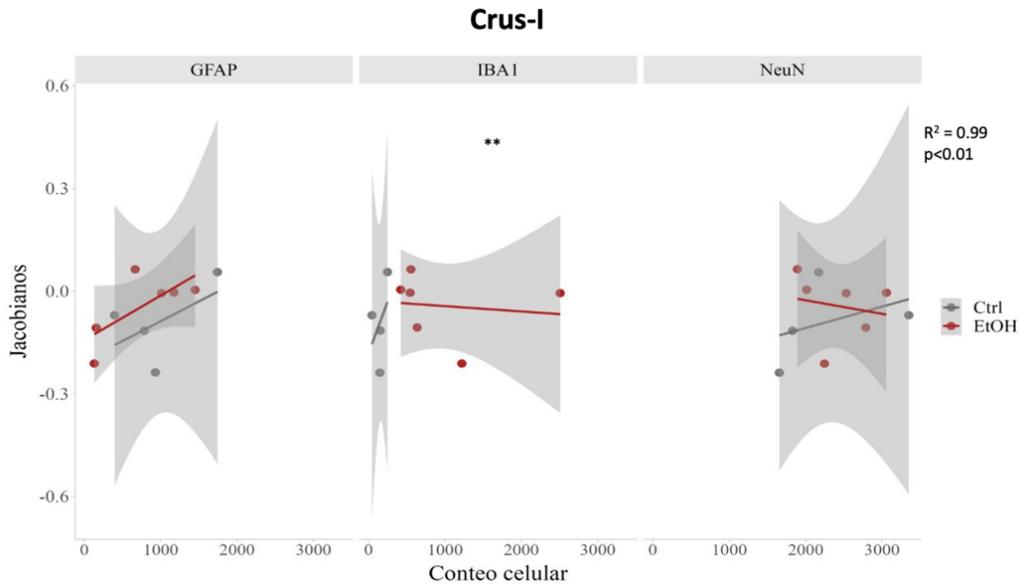


Figura 17: Análisis de Regresión Lineal en Crus-I del Cerebelo. Coeficiente de Determinación Ajustado (R^2 ajustado) = 0.99; Valor de probabilidad (p) < 0.01.

En la región de Lobulo X del cerebelo se obtuvo una R^2 ajustada de 0.28 y una p en conjunto de 0.71, sin ninguna variable con especial significancia explicativa (Figura 18).

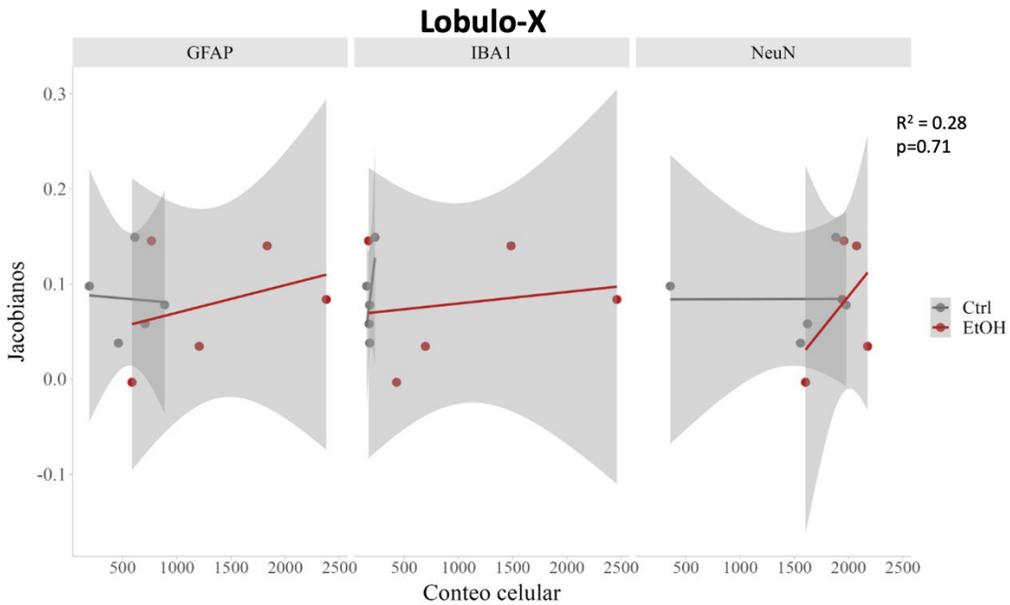


Figura 18: Análisis de Regresión Lineal en Lobulo X del Cerebelo. Coeficiente de Determinación Ajustado (R^2 ajustado) = 0.28; Valor de probabilidad (p) = 0.71.

Capítulo V Discusión y Conclusiones

V.1) Morfometría Basada en Deformación

H1: Existirán diferencias volumétricas cerebrales detectables por resonancia magnética. Habrá un mayor volumen en corteza prefrontal, estriado ventral, estriado dorsal, área tegmental ventral; y un menor volumen en hipocampo y cerebelo en ratas en el grupo de consumo crónico de alcohol comparadas con el grupo control.

Estudios previos en donde correlacionan resonancia magnética e histología (Vetreno, 2017), muestran ya cómo las diferencias volumétricas observadas por RM tienen validación mediante su correlato histológico. Interessantemente, nuestros resultados coinciden en detectar incremento en áreas corticales. Vetreno detecta incremento de volumen desde la corteza cingulada (-0.30mm Bregma) hasta la corteza Retrosplenial (-2.12mm Bregma); nosotros detectamos un incremento del volumen local a la altura de la corteza Retrosplenial Granular (-2.70mm Bregma). Sin embargo, Vetreno reporta que no hay diferencias de volumen en estriado, mientras que nosotros detectamos cambios en estriado ventral, estriado dorsal. Asimismo, Vetreno reporta una disminución de volumen del cerebelo, mientras que en nuestro modelo se vio un importante incremento de volumen en esta región. Más aún, nuestro modelo detecta cambios en VTA y PCM. Estas diferencias se pueden deber a variaciones en los modelos de alcohol y los métodos de análisis resaltadas en la Tabla 5.

	Vetreno, 2017	Modelo empleado
Duración	P25 a P55	P45 a P135
Exposiciones	15 exposiciones en 30 días	30 exposiciones en 90 días
Vía de consumo	Intragástrica (forzado)	Acceso intermitente (voluntario)
Abstinencia	25 a 165 días al final del modelo	20 días a la mitad del modelo seguido de una etapa de recaída
Método de Análisis	Ecuaciones diferenciales parciales de Laplace: especializado en detectar cambios locales (corticales) pero no toma en cuenta el resto del cerebro (regiones más profundas)	Morfometría basada en Deformación: detecta diferencias de volumen a través de todo el cerebro

Tabla 5: Comparación entre modelos de alcohol. Vetreno (2017) emplea un modelo de consumo crónico forzado y utiliza un método de análisis especialmente dirigido a corteza cerebral; en nuestro experimento, usamos un modelo de consumo crónico voluntario con un método de análisis que toma en cuenta todo el cerebro.

Otro hallazgo curioso de los resultados de morfometría es la asimetría que muestra el efecto (Tabla 3: Resultados del análisis de Morfometría basada en Deformación). Recientemente, estudios de espectroscopia en el infrarrojo cercano (Near-Infrared Spectroscopy: fNIRS), una alternativa de la fMRI, midió cambios del control inhibitorio relacionados al consumo agudo de alcohol. Estos cambios, clásicamente se miden con paradigmas *Go/No-go* o *Stop-signal* (118). Mediante modelos generales lineales, pudieron observar una lateralización de la función hacia la corteza prefrontal derecha en pacientes controles al realizar las tareas. Usando a los mismos sujetos como referencias, se midió el efecto de bajas (BAC:0.04) y moderadas (BAC:0.08) concentraciones de alcohol. Encontraron que en cantidades moderadas, tanto la eficiencia en la realización de la tarea como la lateralización de la actividad se veían disminuidas (118). Como se sabe, el alcohol altera el control inhibitorio (118). Estudios de conectómica reportan que la corteza prefrontal derecha está más relacionada con control inhibitorio y la izquierda con la *default network* (118). Esto nos sugiere 1) que, si bien, estructuralmente el cerebro parece simétrico, funcionalmente no lo es; y 2) que perfusión tisular pudiera estar estrechamente implicada en el mecanismo de acción del alcohol. Esto podría direccionarnos a la respuesta de porqué se encuentran cambios lateralizados en los análisis de morfometría.

En conclusión, sí existieron diferencias volumétricas entre ambos grupos detectadas por resonancia magnética. Además, se observaron aumentos y disminuciones de volumen en regiones específicas del grupo expuesto al etanol en comparación con el grupo de control, en consonancia con hallazgos de estudios funcionales previos. No obstante, se observa cierta disparidad entre nuestros resultados y los reportados en investigaciones previas. Esta variabilidad podría atribuirse a disparidades en el modelo y el método implementado y/o al estadio de la enfermedad.

V.2) Correlato Histológico

Pese al control de variables mediante la implementación de modelos animales, existe una alta heterogeneidad al evaluar trastornos neuropsiquiátricos (115), lo que ha dificultado la definición de patrones, y, por subsiguiente, el establecimiento de biomarcadores y tratamientos definitivos. Además, la técnica empleada para analizar las IRM utiliza un método estadístico de voxel por voxel. La interpretación de estos análisis estadísticos puede llevar a hallazgos que en realidad sean falsos positivos. Para prevenir esto, se empleó un método de corrección de múltiples pruebas, llamado tasa de falso descubrimiento (*false rate discovery*, FDR). Sin embargo, esto no exime el hallazgo de falsos positivos. Para comprobar la veracidad de estos hallazgos, se realizó un estudio histológico de las ROI. La técnica histológica empleada fue inmunofluorescencia. Esta técnica tiene alta especificidad debido al pareamiento de anticuerpos, sin embargo esto mismo hace que carezca de capacidad para detectar componentes no marcados que se encuentran en el tejido nervioso, tales como neuritas, matriz extracelular, vasos, espacio extracelular, oligodendrocitos, etc. Justificado por la dinámica entre neuronas, astrocitos y microglía en procesos inflamatorios y maladaptativos, como es el trastorno por consumo de alcohol, se eligieron anticuerpos que detectaran estas células. De forma interesante, se encontró una correspondencia entre los

hallazgos por resonancia y los histológicos: disminuciones de volumen apreciables por resonancia, correspondieron con gliosis y cicatrices gliales (conglomerados de microglía y astrocitos); aumentos de volumen detectados por resonancia, correspondieron con un patrón más disperso, pero también aumentado de astrocitos y microglía. Esto podría indicar diferencias en los mecanismos o estadios del proceso inflamatorio. Más aún, en ambos casos, los sitios de lesión se encontraron siempre en relación con vasos sanguíneos. Se observó una dilatación de los vasos sanguíneos proximales y cierta direccionalidad de las células con respecto a los vasos. En la Figura 19, se puede apreciar la contigüidad existente entre los vasos y el sitio de lesión en las 3 regiones de interés estudiadas.

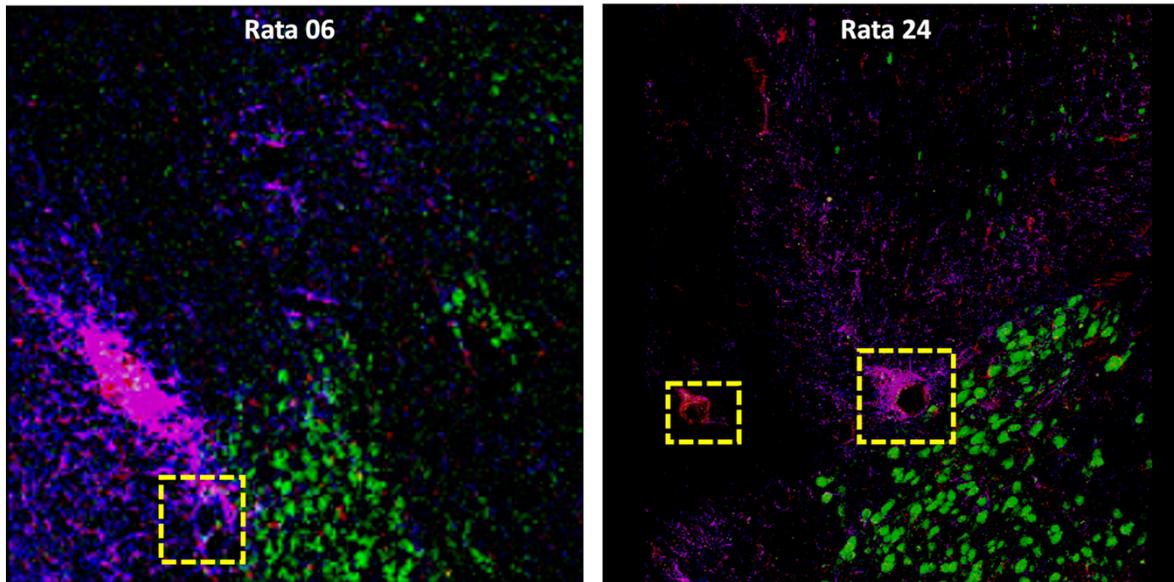


Figura 19 Comparación entre dos sujetos expuestos a alcohol en Pedúnculo Cerebeloso Medio. Los recuadros punteados señalan los vasos. Objetivo 40x, Merge (Verde:NeuN; Rojo: Iba-1; Azúl:GFAP)

En la figura 19 se pueden ver dos ejemplos del efecto en PCM en ratas con exposición etanol. Se aprecia mayor tamaño del efecto en la rata 06 que en la rata 24 denotado por el tamaño de la cicatriz glial. En ambas se observa una estrecha relación con un vaso sanguíneo cercano a los núcleos pontinos, posiblemente eferente de la arteria cerebelar superior. Este vaso se encuentra dilatado en ambos casos. Este hallazgo puede relacionarse con los estudios funcionales previamente comentados y cómo es que la perfusión y la funcionalidad son factores que determinan la asimetría de los resultados. Mientras que en la rata 06 se puede observar una franca lesión, en la rata 24 se puede apreciar mejor cómo tanto la microglía como los astrocitos parecen presentar cierta migración desde/hacia el vaso. También es de notar que en la rata con menor efecto (rata 24), los somas neuronales están mejor delimitados que los somas neuronales en la rata con mayor efecto (rata 06). Al revisar las diferencias de volumen por la morfometría, se encontró que las ratas controles contaban con jacobianos de 0.1233 a 0.3296, mientras que las ratas con exposición a alcohol contaban con volúmenes 0.0767 a 0.1946. Poniendo las imágenes en orden de menor a mayor según el volumen detectado por el DBM (Figura 20), nos damos cuenta que el menor volumen corresponde a una cicatriz glial marcada (Rata 06), mientras que para las ratas 85 y 24 no existe una gran diferencia cualitativa en el efecto pero sí una relación con respecto a los vasos. Cabe notar que, de las ratas con exposición a alcohol, que tienen un volumen comparable con las

controles (Rata 43), se encuentra una gliosis más diseminada, como la que se aprecia en regiones cerebelosas (las cuales destacaron por su incremento de tamaño). Se pone en contraste una la rata 03 control. Nótese que en la región del PCM, la rata control solamente contiene astrocitos, a diferencia de las rata con exposición a alcohol en las cuales se ve una acentuada infiltración de microglía.

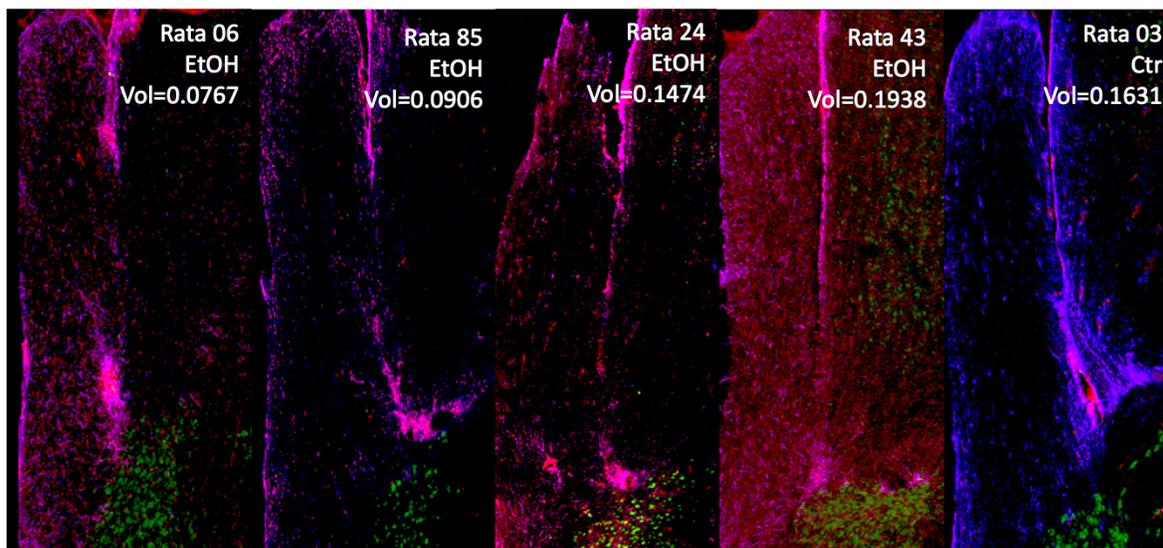


Figura 20: Comparación del volumen detectado por morfometría y los hallazgos de microscopía.

Esta comparación nos hace preguntarnos si las diferencias encontradas en el proceso inflamatorio se debe a la heterogeneidad del trastorno o a diferencias en el estadio. Para contestar esa pregunta se necesitaría emplear estudios de proteómica o transcriptómica para intentar diferencias entre los procesos inflamatorios y un modelo de alcohol forzado para intentar mantener, a manera de lo posible, el mismo consumo en las ratas.

Por otro lado, esta comparación nos habla de que, si bien, la morfometría presenta la desventaja de la especificidad, es lo suficientemente sensible para detectar cambios microestructurales.

Ahondando en la participación de los vasos, se ha visto que macrófagos de regiones cercanas, como la piamadre, pueden ser reclutados mediante quimiocinas y diferenciarse en células tipo microglía (*microglia-like cells*; 116). Incluso, se ha reportado que macrófagos de la periferia pueden migrar al sitio de lesión y ser más abundantes que la microglía regional (117). Pese a su parecido, al no poseer las mismas propiedades que la microglía, esta infiltración de macrófagos periféricos y células tipo microglía puede causar alteraciones en las dinámicas neuronales y propiciar el inicio y/o evolución de patologías (116, 117). Este hecho denota la necesidad de pasar de un enfoque neurocentrista a uno en que tome en cuenta las interacciones entre los diversos componentes del tejido nervioso.

V.3) Conteo Celular

H2: Existirán diferencias en el conteo neuronal, astrocitaria y microglial detectables mediante inmunofluorescencia (NeuN, GFAP e Iba1) en las regiones de interés marcadas por análisis volumétricos.

En las tres regiones de interés (ROIs), se pudo observar un incremento más pronunciado en la actividad microglial, seguido por la respuesta astrocítica. Sin embargo, no se identificaron cambios significativos en el recuento de neuronas (ver Figuras 13, 14 y 15). Estos incrementos posiblemente son resultado de las interacciones complejas que ocurren entre las neuronas, las microglías y los astrocitos, tal como se detalló en las secciones correspondientes sobre la "Relación entre Neuronas-Astrocitos-Microglia", "Plasticidad sináptica" y "Neuroinflamación, gliopatía y plasticidad maladaptativa" en el marco teórico de esta tesis. Es importante recordar que se ha propuesto que las manifestaciones conductuales observadas en el Trastorno por Consumo de Alcohol son resultado de cambios maladaptativos ocasionados tanto por un proceso inflamatorio crónico como por los efectos directos del alcohol (26, 33, 40, 102-106). Aunque es necesario llevar a cabo más estudios para detectar cambios en la conectividad neuronal, como podría ser a través de enfoques macroscópicos como la conectómica, o microscópicos como la tinción de CNPasa, la marcada gliosis observada en esta investigación es una clara evidencia del proceso inflamatorio en curso.

Por otra parte, es importante destacar que el recuento celular se ve sesgado en las áreas con un efecto más marcado. Tanto en el enfoque manual como en el automatizado, se tiende a subestimar el número de células debido a la formación de conglomerados, en donde no es posible determinar el número preciso de células que se encuentran. Además, la presencia de heterogeneidad en el efecto (como se observa en la Figura 20) complica el análisis. Por un lado, se evidencia un incremento en el número de células individuales, mientras que por otro lado, se observa una respuesta glial en forma de cicatriz sin un aumento notorio en el recuento de células individuales. Para abordar esta problemática, podría resultar beneficioso considerar enfoques analíticos alternativos. Esto podría incluir la adopción de técnicas más avanzadas, como el uso de librerías de Python para el conteo celular (CV2, scipy, skimage), o la implementación de otra variable para destacar las diferencias, como la medición del área ocupada por la marca en lugar de centrarse exclusivamente en el conteo de células. Además, realizar un muestreo en áreas específicas dentro de las regiones de interés podría proporcionar una mayor claridad al resaltar las diferencias presentes en la respuesta celular en ubicaciones particulares, lo que a su vez podría aumentar la magnitud del efecto. Estas estrategias podrían ser de utilidad para superar los desafíos derivados de la heterogeneidad y la subestimación del recuento celular en las áreas de mayor impacto.

En conclusión, se observa un incremento en el conteo astrocitario del y de microglía entre el grupo control y el grupo expuesto a etanol identificadas mediante técnicas de inmunofluorescencia en las regiones destacadas por el análisis de morfometría. No obstante, es importante destacar que existe una variabilidad en la magnitud de estos efectos, lo que complica la distinción clara entre los grupos.

V.4) Regresión Lineal Múltiple

H3: Existirá una relación lineal positiva/negativa entre los cambios macroestructurales (jacobiano) y microestructurales (conteo celular) comprobable mediante una regresión múltiple.

Los resultados presentados en las Figuras 16, 17 y 18 muestran que la regresión lineal múltiple se presenta como un modelo explicativo sólido en la región Crus-I del cerebelo (R^2 ajustada de 0.99 y un valor de $p < 0.01$), así como en el pedúnculo cerebeloso medio (R^2 ajustada de 0.96 y un valor de $p = 0.13$). Sin embargo, este poder explicativo no se observa en el Lóbulo X del cerebelo (R^2 ajustada de 0.28 y un valor de $p = 0.28$). Es interesante notar las discrepancias en los resultados entre estas regiones cerebelosas, a pesar de que tanto el análisis morfométrico como el de conteo celular arrojan resultados similares. Al observar detenidamente las Figuras 17 y 18, se puede notar que en la región de Crus-I existe una mayor correlación entre los conteos celulares y los volúmenes en cada sujeto, mientras que en la región del Lóbulo X, los aumentos/disminuciones de volumen no necesariamente coinciden con los aumentos/disminuciones en los conteos celulares. Esta discrepancia podría atribuirse a diferencias biológicas en los procesos inflamatorios.

Asimismo, en la región del pedúnculo cerebeloso medio, los volúmenes más reducidos concuerdan con conglomerados celulares (cicatriz glial). Al comparar el volumen con los hallazgos histológicos (consultar Figura 20), se puede apreciar un proceso inflamatorio evidente en el grupo de ratas expuestas al alcohol, tanto en sujetos con menor volumen como en sujetos con un volumen similar al del grupo control. La diferencia radica en que las ratas con volúmenes más bajos muestran una convergencia de células gliales produciendo una cicatriz glial, mientras que las ratas con volúmenes similares al grupo control muestran un aumento de células gliales sin formación de conglomerados y con un patrón de distribución más disperso. Es interesante notar estas diferencias intra e interregionales, lo que resalta la complejidad de la patogenia. Sería muy útil profundizar en este aspecto mediante estudios de expresión proteica, como PCR o Western Blot, para analizar las diferencias en los procesos inflamatorios en cada zona.

Además, como se mencionó en la sección de metodología, la distribución de la variable respuesta, en este caso, el volumen determinado por el jacobiano, se ve influida por el ruido o por covariables no consideradas en el modelo. Dada la heterogeneidad patológica observada en los hallazgos histológicos, tanto inter como intra regiones, es posible que en cada región existan covariables con mayor poder explicativo específicas para esa zona de estudio. Por ejemplo, en la región de PCM, en los casos de menor volumen, podría ser que existiera una degeneración de la matriz extracelular debido a la cicatriz glial, lo que podría ser más explicativo para determinar las diferencias en el volumen.

Por otro lado, es importante mencionar que la determinación del número de células que componen los conglomerados (cicatriz glial) resulta poco precisa. En estos casos, dada la alta expresión de Iba-1 y GFAP en la región de la cicatriz glial y el solapamiento entre las células, no es posible segmentar adecuadamente las células. Esto conduce a una inferencia sesgada del volumen basada en el conteo celular, estimando un bajo recuento cuando, en realidad, existe un mayor número de células pero estas se encuentran concentradas en un solo punto.

También, es evidente que el fenómeno estudiado es altamente complejo, lo que dificulta su caracterización. Esto se refleja en la variabilidad de la expresión patológica en el grupo de ratas expuestas a alcohol. Esta variabilidad se manifiesta con efectos tanto de aumento como de disminución de volúmenes locales para cada región cerebral y para cada sujeto. Al estudiar estos efectos histológicamente, se hace más evidente la complejidad al encontrar que cada región puede estar experimentando diferentes procesos inflamatorios al momento de la adquisición de las imágenes de resonancia magnética, así como al momento de la perfusión. Por lo tanto, el fenómeno puede no seguir una distribución patrón determinística, sino más bien comportarse como un fenómeno caótico, lo que dificultaría su predicción a largo plazo y representaría un desafío estadístico. Por otro lado, si se plantease que estas discrepancias en los hallazgos se debiesen a diferencias en el estadio de la enfermedad, sería beneficioso considerar la implementación de modelos de alcohol forzado con el propósito de lograr una mayor uniformidad en los resultados.

En conclusión, aunque los modelos de regresión lineal pueden explicar cierta asociación entre el volumen y el contenido celular en función de las células seleccionadas y el volumen en un punto específico, no es posible generalizar su capacidad explicativa para todas las regiones debido a la diversidad en los hallazgos histológicos observados en cada región. Por ende, con el fin de obtener una caracterización más exhaustiva de esta patología neuropsiquiátrica, sería adecuado explorar métodos dinámicos no lineales que se esfuercen en modelar los distintos escenarios de la enfermedad a lo largo del tiempo, con el objetivo de detectar los puntos de inflexión correspondientes a cada fenotipo.

En el presente estudio, se ha investigado a profundidad el impacto del consumo crónico de alcohol en el cerebro de ratas utilizando una variedad de técnicas, incluyendo resonancia magnética, morfometría basada en deformación, correlato histológico, conteo celular y regresión lineal múltiple. Los resultados y conclusiones generales obtenidos de estas investigaciones proporcionan una visión más completa de los efectos del alcohol en el cerebro, destacando la complejidad y la variabilidad de los cambios observados en diferentes regiones cerebrales.

En primer lugar, se ha corroborado que el consumo crónico de alcohol provoca diferencias volumétricas cerebrales que son discernibles mediante resonancia magnética. Estas diferencias comprenden una disminución en el volumen de áreas como el Bulbo Olfatorio, el Núcleo Accumbens, el Caudado-Putamen, el Área Tegmental Ventral y el Pedúnculo Cerebeloso Medio, además de un aumento en las regiones que incluyen la Corteza Retrosplenial y en el cerebelo en la región Crus-I y los Lóbulos VIII-X. No obstante, es importante señalar que se ha observado una cierta discrepancia en los resultados en comparación con investigaciones previas, lo que apunta a la posible influencia de variaciones en los modelos de alcohol y los métodos de análisis utilizados.

En segundo lugar, los hallazgos histológicos han respaldado los resultados de resonancia magnética, revelando la presencia de gliosis y cicatrices gliales en regiones donde se detectaron reducciones de volumen por morfometría, así como un aumento en el número de astrocitos y microglía en regiones con aumentos de volumen. Estos hallazgos indican la

presencia de un proceso inflamatorio en curso en el grupo expuesto al alcohol y subrayan la importancia de considerar las interacciones entre los componentes del tejido nervioso.

En tercer lugar, se ha confirmado que existen diferencias en el conteo neuronal, astrocitario y microglial entre el grupo control y el grupo expuesto al alcohol en las regiones de interés identificadas por análisis volumétricos (DBM). Sin embargo, se ha destacado la variabilidad en la magnitud de estos efectos, lo que sugiere la complejidad de la respuesta celular en cada región y la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente estos cambios.

Finalmente, se ha explorado la relación entre los cambios macroestructurales y microestructurales a través de la regresión lineal múltiple, revelando una relación sólida en la región de Crus-I del cerebelo y el pedúnculo cerebeloso medio, pero no el lóbulo X del cerebelo. Esto sugiere que las diferencias en la naturaleza de los procesos inflamatorios pueden influir en la relación entre el volumen cerebral y el conteo celular en diferentes regiones.

En conjunto, estas conclusiones resaltan la complejidad de la respuesta del cerebro al consumo crónico de alcohol y subrayan la importancia de considerar tanto los cambios macroestructurales como los microestructurales en la comprensión de los efectos del alcohol en el cerebro. Estos hallazgos tienen implicaciones significativas para la investigación y el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos relacionados con el consumo de alcohol y destacan la necesidad de investigaciones futuras más detalladas para abordar la variabilidad en la respuesta cerebral a este trastorno.

Capítulo VI Perspectiva

La investigación llevada a cabo ha proporcionado descubrimientos innovadores al validar los resultados obtenidos mediante análisis morfométricos por resonancia magnética con hallazgos histológicos. Esto confirma la sensibilidad de los estudios de morfometría. No obstante, es crucial reconocer que este estudio representa un primer paso hacia la caracterización de los procesos neurobiológicos que subyacen a los fenómenos neuropsiquiátricos, como lo es el trastorno por consumo de alcohol. A continuación, se presentan tres futuras direcciones de investigación que podrían ampliar nuestro conocimiento sobre los efectos del consumo crónico de alcohol:

1) Estudio Histológico Avanzado y Análisis de Morfología: Aunque el conteo celular y la inmunofluorescencia han demostrado ser útiles para confirmar los hallazgos de la resonancia magnética, es esencial profundizar en el análisis histológico. Incorporar técnicas más detalladas, como el análisis de la morfología celular de microglía y astrocitos, permitirá comprender en mayor profundidad las modificaciones inducidas por el alcohol en el tejido cerebral. Además, la implementación de herramientas avanzadas como el lenguaje de programación Python en lugar de ImageJ podría optimizar y agilizar este proceso al permitir un análisis automatizado y adaptado a las imágenes microscópicas. Detalles adicionales se presentan en el Anexo V.

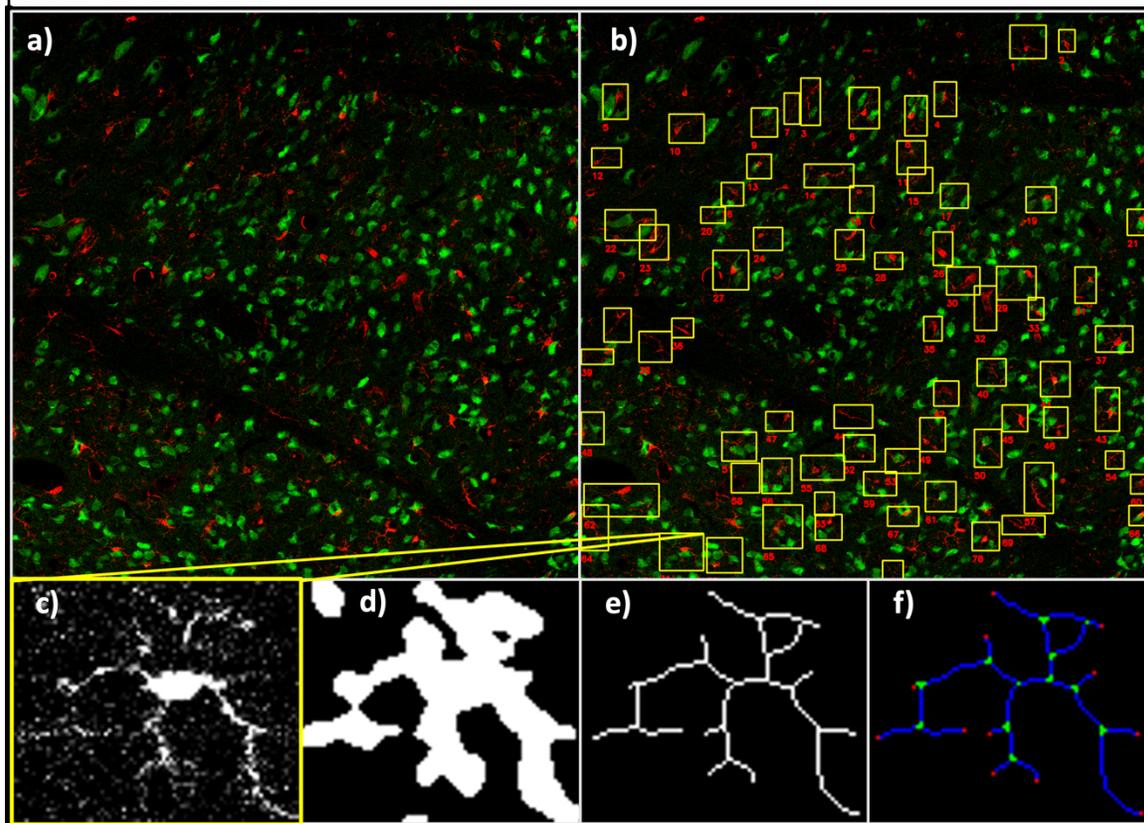


Figura 21: Análisis Morfológico. a) Imagen capturada mediante microscopio confocal a 40x de aumento; b) Detección automatizada de microglía; c) Identificación de células individuales; d) Aplicación de umbralización; e) Generación de esqueletos; f) Generación de puntos finales (rojo), ramificaciones (azul) y puntos de conexión (verde).

2) **Estudio de Imágenes de Resonancia Magnética Ponderadas por Difusión:** Una dirección prometedora para futuras investigaciones en este estudio sería el empleo de imágenes ponderadas por difusión en resonancia magnética. Estas imágenes brindan la ventaja de proporcionar información sobre los cambios microestructurales en el tejido cerebral, otorgando una perspectiva más específica sobre las alteraciones producidas por el consumo crónico de alcohol que los análisis morfométricos. Además, esta técnica podría revelar información valiosa acerca de posibles cambios en la sustancia blanca cerebral (no identificados en este proyecto mediante marcadores histológicos), lo que ofrecería un entendimiento más profundo de las conexiones neuronales y la integridad estructural del tejido. Se profundiza sobre esta técnica y se muestran resultados preliminares de este abordaje en el Anexo VI.

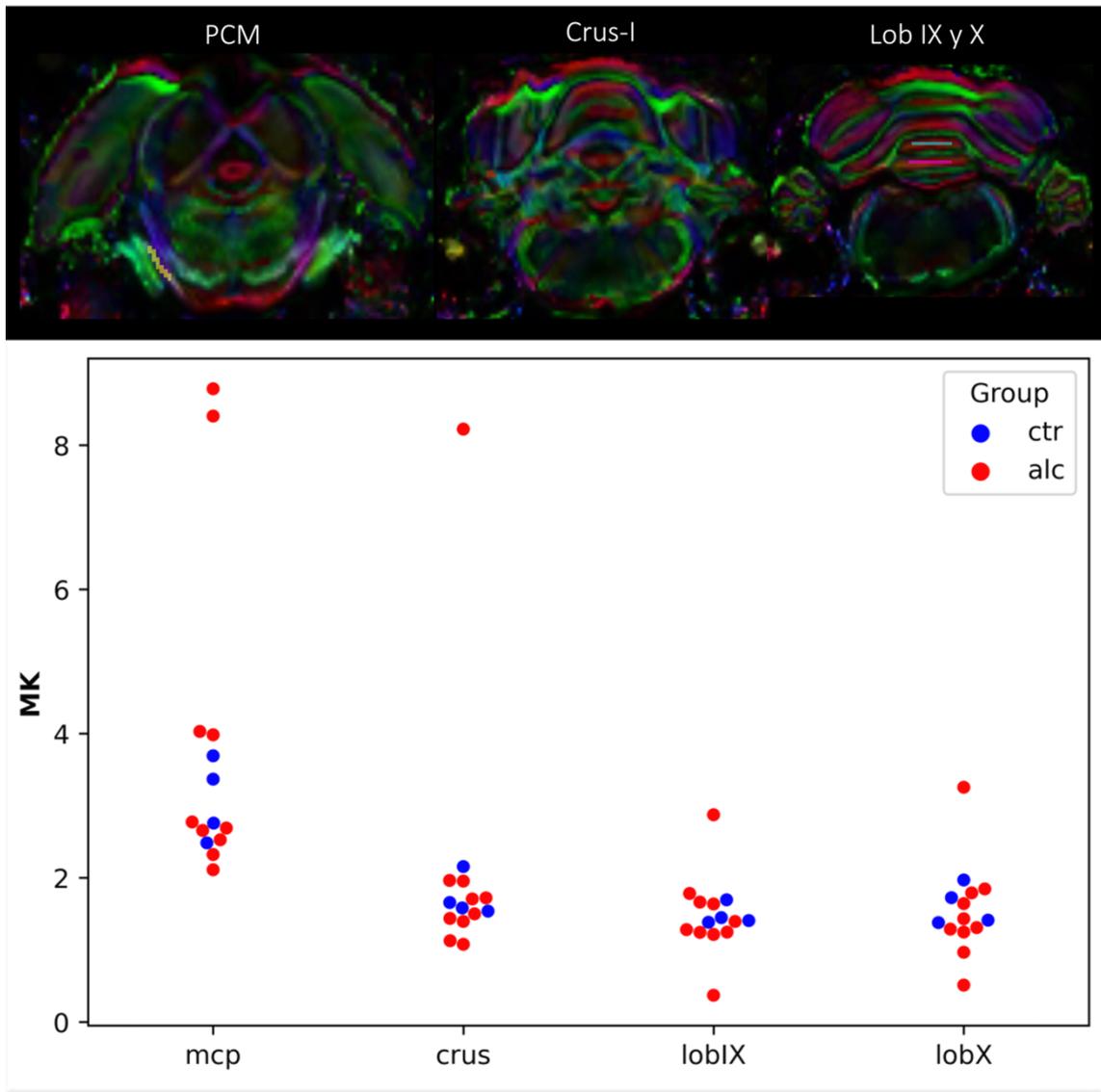


Figura 22 Análisis basado en regiones de interés y distribución de la kurtosis media en las regiones de interés. PCM: pedúnculo cerebeloso medio; Crus-I del cerebelo; Lob: lóbulo IX y X del cerebelo.

3) **Estudio de Órganos Periféricos y su Impacto en la Patogenia:** Dado que las enfermedades neuropsiquiátricas, como el alcoholismo, pueden tener efectos sistémicos, es crucial explorar cómo los órganos periféricos contribuyen a la patogenia de estas condiciones. Investigar el impacto del consumo crónico de alcohol en órganos como el hígado, el bazo y el intestino podría proporcionar perspicacia sobre las vías biológicas que conectan el sistema nervioso central con el periférico. Esta investigación puede esclarecer la compleja interacción entre los órganos y ayudar a comprender mejor los mecanismos subyacentes de las enfermedades neuropsiquiátricas. Se presentan evidencias y resultados preliminares en el Anexo VII.

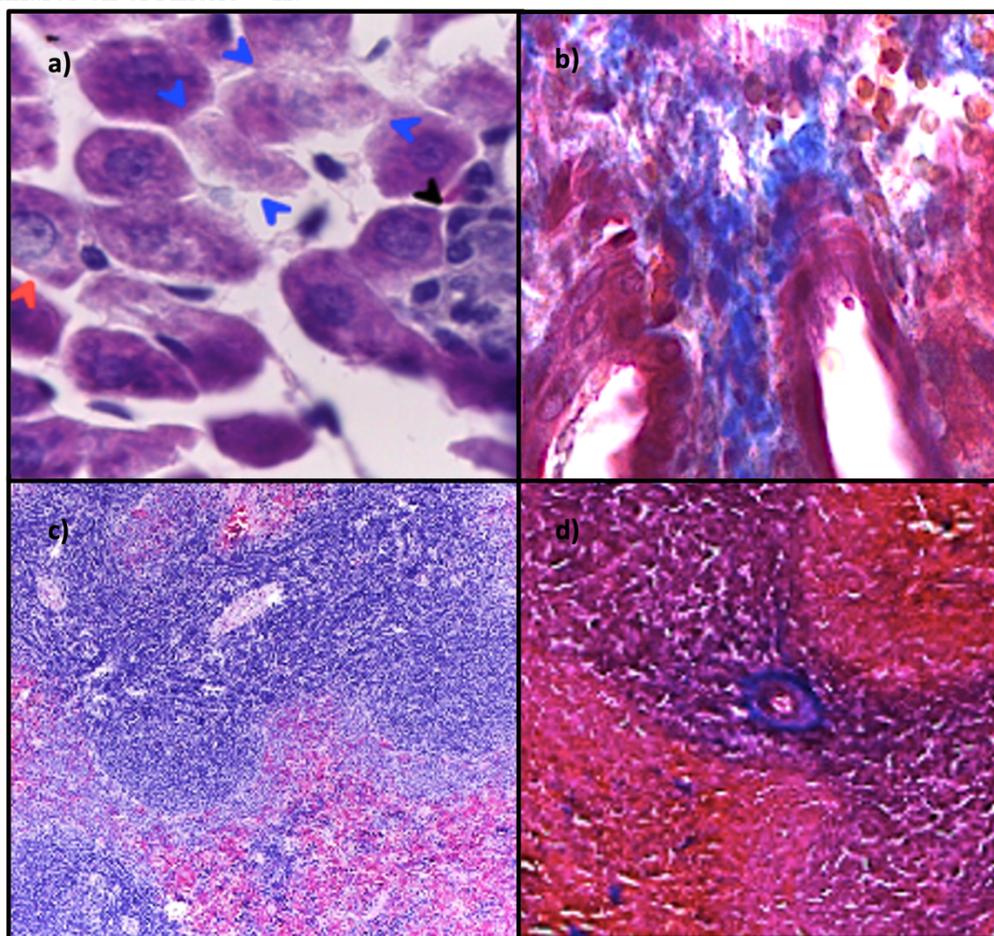


Figura 23: Hallazgos Histológicos en Hígado y Bazo de Ratas con Consumo Crónico de Alcohol, evaluados mediante H&E y Tricrómico de Masson. a) Imagen de Hígado teñido con H&E, las cabezas de flecha indican diversas alteraciones (consultar Anexo V para detalles); b) Característico patrón de "alambrado de gallina" en el Hígado teñido con Tricrómico de Masson; c) Solapamiento de Centros Germinales en el Bazo de ratas expuestas a alcohol, teñido con H&E; d) Superposición de Centros Germinales y presencia de fibrosis sobre el centro germinal, teñido con Tricrómico de Masson.

En resumen, esta investigación ha establecido las bases para una comprensión más profunda de los efectos del consumo crónico de alcohol en el cerebro. Sin embargo, aún existen grandes oportunidades para expandir nuestro conocimiento en esta área. Explorar enfoques histológicos avanzados, incorporar técnicas de resonancia magnética ponderada por difusión y analizar el papel de los órganos periféricos son tres direcciones prometedoras que nos permitirán obtener una visión más completa de la patogenia producida por el consumo de alcohol.

ANEXO I: Morfometría Basada en Deformación

La morfometría basada en deformación (*deformation based morphometry*, DBM) es un método que caracteriza las diferencias en los campos vectoriales que describen diferencias globales o gruesas en la forma del cerebro (106). Este método requiere una normalización de imágenes estructurales por resonancia magnética de los diferentes sujetos, de tal manera que todas las imágenes se encuentren en el mismo espacio estereotáxico (70,71). Es decir, se usa una plantilla anatómica como estandarización espacial (106). Una vez estandarizado el espacio anatómico (normalizado), los campos vectoriales de diferentes sujetos se usan como variantes no-lineales, comparándolos contra la plantilla (106). De la diferencia entre el campo vectorial de la plantilla y los campos vectoriales de los sujetos se obtienen los campos de deformación (106). Como los campos de deformación son multivariable, se emplean técnicas estadísticas multivariable para hacer inferencias (voxel wise analysis) sobre las diferencias encontradas, detectando diferencias globales o regionales entre los cerebros (70, 71, 72, 106).

Los análisis por voxel (voxel wise analysis) son técnicas usadas para analizar voxel por voxel de las IRM. Estas técnicas realizan test estadísticos (t-test, ANOVA, correlación, regresión) de cada voxel para localizar variaciones en los datos (106). Sin embargo, se deben emplear métodos de corrección (multiple comparisons correction) para disminuir la cantidad de falsos positivos provocada por los análisis simultáneos. Ejemplos de estos métodos son el *family-wise error rate* y el *false discovery rate*. El objetivo de la DBM es obtener un valor P tal que sea significativo del efecto y uno o más vectores canónicos (o deformaciones) que caractericen su naturaleza (106).

Los resultados significativos se visualizan usando mapas paramétricos estadísticos (parametrical statistic maps: SPMs) que muestran los resultados en un contexto espacial (106). De las ventajas de emplear este análisis es que permite detectar diferencias en forma y tamaño sin definir a priori regiones de interés ni marcar límites anatómicos y que es automatizada, por lo que es completamente reproducible (87, 106). Esta es la importancia de los métodos morfométricos como indicadores neurobiológicos asociados a una enfermedad. Debido a que el AUD es un trastorno complejo multicausal, su estudio desde este abordaje permite encontrar los dominios estructurales que estén involucrados en su patología.

ANEXO II: Regresión Lineal

Los análisis de regresión son técnicas estadísticas que nos permiten entender la relación entre variables. Un modelo lineal tiene la siguiente forma (112):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$$

Donde β_0 es el intercepto, β_1 es la pendiente, ε es el error, x es la variable regresor o predictor y y es la variable respuesta. Cuando solo se tiene una variable predictora, se clasifica como modelo lineal simple. Uno de los principales objetivos de los análisis de regresión es estimar los parámetros no observados (intercepto y pendiente) para que el modelo se ajuste a los datos. Una forma comúnmente utilizada de ajuste es el método de mínimos cuadrados (112).

La pendiente β_1 nos dice cómo un cambio en la unidad de x se relaciona con un cambio en el promedio de y . La variable y es la suma de las constantes β_0 , β_1 y una variable distribuida aleatoriamente (ε), por lo tanto y es una distribución aleatoria normal. Esto quiere decir que para cada valor x , hay una distribución de valores y determinada por la varianza de ε . Por ende, la varianza σ^2 muestra la cantidad de ruido en las observaciones y . Si σ^2 es pequeña, las observaciones estarán más próximas a la línea de regresión; si σ^2 es grande, las observaciones estarán más alejadas (112).

Cabe recordar que los modelos de regresión son sólo aproximaciones a la verdadera relación entre las variables de interés. Por lo que, cuando el mecanismo a describir es más complejo, pueden ser necesarias funciones más avanzadas para aproximarse al fenómeno. Además, las ecuaciones de regresión son sólo válidas dentro del rango de las observaciones de x , es decir, en un intervalo $x_1 \leq x \leq x_2$. Esto hace que el desempeño del modelo dependa del estadio de la observaciones.

En casos más generales, la variable respuesta y puede depender de k predictores (112):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

Esto se conoce como modelo de regresión lineal múltiple, ya que utiliza más de un predictor. Aunque se use el adjetivo “lineal”, esto no se refiere a que el modelo es lineal con respecto de x , sino porque es lineal en los parámetros β . Por lo que, incluso en casos en el que y se comporte de una forma no lineal con respecto a x , aún puede ser modelado mediante modelos de regresión lineal, siempre y cuando el fenómeno sea lineal en cuanto a las β 's (112).

ANEXO III: Protocolo Inmunofluorescencia

Previo, la muestra se crioprotege con una solución de sacarosa al 30%; se congela la muestra usando el método de congelamiento rápido con hielo seco y etanol (flash freezing samples dry ice/etanol bath); se guarda a -70°C hasta el día de su seccionamiento; y se obtienen muestras del grosor deseado (en este caso 40 micras) usando un criostato.

1. Colocar las muestras a temperatura ambiente durante 1 hora.
2. Realizar 3 lavados de 10 min c/u en **PBS** con agitación suave.
3. Añadir **solución de bloqueo** durante 2 horas a temperatura ambiente, agitación suave.
4. Colocar la solución de incubación con los **anticuerpos primarios** durante 16-18 horas (overnight) en agitación suave a 4°C .
5. Realizar 3 lavados de 10 min c/u en **PBS** con agitación suave.
6. Incubar las muestras con **anticuerpos secundarios** durante 2 horas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente.
7. Realizar 3 lavados de 10 min c/u en **PBS** con agitación suave (en oscuridad)
8. Montar las muestras con 10-15 μl de medio de montaje Vectashield (con/sin DAPI).
9. Cubrir las muestras con un cubreobjetos y sellar con barniz.
10. Guardar las muestras a 4°C y protegidas de la luz hasta su análisis.

Anticuerpo	Dilución	Catálogo
Rat anti-Iba1	1:1000	ab283346
Mouse anti-GFAP	1:1000	MAB360
Rabbit anti-NeuN	1:1000	ABN78
Goat anti-rat A-555	1:1000	ab150158
Goat anti-mouse A-488	1:1000	ab150113
Goat anti-rabbit A-647	1:1000	ab150079

Tabla 6: Diluciones Estandarizadas de Anticuerpos. La tabla presenta las diluciones específicas a las que se ajustaron los anticuerpos utilizados en este estudio, junto con sus números de catálogo correspondientes para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Soluciones

Solución Buffer de fosfatos (PBS):

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio	8.06g
Cloruro de potasio	0.22g
Fosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	1.15g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2g
Agua destilada	Aforar a 1L

Ajustar pH a 7.4. Almacenar en refrigeración

Solución de Bloqueo:

Reactivo	Cantidad
Goat serum o Bovine Serum Albumin	5%
Triton X-100	0.1%
PBS	94.9%

Preparar al momento. Usar de 300-400 microlitros por pozo

Solución de Incubación con anticuerpos Primarios:

Reactivo	Cantidad
Goat serum o Bovine Serum Albumin	5%
Triton X-100	0.1%
Anticuerpos	Si la titulación es 1:1000, entonces es 0.1% para cada anticuerpo pero esto podría variar dependiendo la marca del anticuerpo, el grosor del tejido y el tipo de tejido
PBS	Aforar (aproximadamente 94%)

Preparar al momento. Usar de 300-400 microlitros por pozo

Solución de Incubación con anticuerpos Secundarios:

Reactivo	Cantidad
Goat serum o Bovine Serum Albumin	5%
Triton X-100	0.1%
Anticuerpos	Si la titulación es 1:1000, entonces es 0.1% para cada anticuerpo pero esto podría variar dependiendo la marca del anticuerpo, el grosor del tejido y el tipo de tejido
PBS	Aforar (aproximadamente 94%)

Preparar al momento. Usar de 300-400 microlitros por pozo

ANEXO IV: Experimento de automatización del conteo celular

La segmentación de imágenes es un tipo de procesamiento de imágenes que busca separar una imagen en múltiples segmentos lógicos. Los segmentos pueden ser definidos como píxeles que comparten características similares (ej. intensidad, textura, color) los cuales permiten detectar que pertenecen al mismo objeto (88). Existen diferentes métodos de segmentación: basada en histograma, basada en región, basada en bordes, basada en ecuaciones diferenciales, basada en modelos (90). Nosotros nos enfocaremos en la binarización, un método basado en histograma, y watershed, un método basado en región.

- **Binarización de imágenes**

El método de binarización de imágenes convierte a los píxeles en valores de 0 o 255 (blanco y negro). En imageJ se emplea el algoritmo de isodata el cual divide a la imagen en objetos y fondo y toma un umbral inicial (93). Después, el promedio de los píxeles por encima y por debajo del umbral se estima. Este umbral se actualiza iterativamente por la nueva intensidad de los píxeles hasta que convergen. Así, la distribución se clasifica en dos grupos (objetos y fondo) usando un umbral, que es el valor de intensidad iterativo seleccionado de un mínimo a un máximo de valores de intensidad. (92)

- **Método Watershed**

Es un método basado en región. En este método se empieza de unos píxeles semillas que se enlazan con sus píxeles circundantes. De esta forma, cada pixel es asignado a una región. El método de watershed identifica las semillas por una reconstrucción morfológica de la imagen. La reconstrucción morfológica de la imagen emplea dos imágenes para implementar las semillas en la imagen original. La primera se conoce como imagen de dilatación $g(i,j)$, un elemento estructurado B , el cuál selecciona los píxeles de mayor valor dentro de una región. Esta operación se define como $g(i,j) \oplus B$. Por lo que la reconstrucción de la imagen f por la g se obtiene por iteraciones

$$g^{k+1}(i,j) = \min\{f(i,j), g^k(i,j) \oplus B\}$$

hasta que g^k encuentre su valor máximo. La segunda imagen utilizada en la reconstrucción morfológica por watershed se conoce como imagen de erosión \tilde{g} , un elemento estructurado B , el cual considera una región de la forma y tamaño de B alrededor de cada pixel de y selecciona los píxeles de menor valor dentro de esa región. Esta operación se denota como $\tilde{g}(i,j) \ominus B$. Por lo que la reconstrucción de la imagen f por la \tilde{g} se obtiene por iteraciones

$$\tilde{g}^{k+1}(i,j) = \min\{f(i,j), \tilde{g}^k(i,j) \ominus B\}$$

los valores máximos de f . Si sustraemos de la imagen f su reconstrucción por \tilde{g} , nos quedaremos con los valores mínimos de f . De esta forma, se pueden establecer semillas que crezcan y segmenten la imagen al acumular más y más píxeles alrededor de ella. Los límites de cada región se establecen cuando una región entra en contacto con otra (91).

En ImageJ, una vez que se ha binarizado la imagen, se obtiene una máscara entre el fondo y el primer plano, pero no tenemos bien delimitados a los objetos. Para poder separarlos, el algoritmo de watershed busca el centro de cada objeto por el método antes mencionado y calcula un mapa de distancias desde el centro de cada objeto hasta sus bordes (94).

Para seleccionar el microscopio adecuado, definir la modalidad de adquisición y establecer un método preciso de conteo celular, realizamos un experimento exhaustivo que involucró la evaluación de múltiples microscopios, objetivos y modalidades de adquisición, abarcando enfoques simples, mosaicos y proyección máxima (consultar Figura 24 y 25). Además, exploramos una variedad de técnicas de procesamiento de imágenes, como Phalsalkar y Bernsen, así como métodos de segmentación, como Watershed, y herramientas automáticas de conteo, como Analyse Particle y 3D Object Counter. Este proceso se llevó a cabo con el objetivo de garantizar la máxima precisión y eficacia en el conteo celular de las imágenes de microscopía de fluorescencia.

Las imágenes se adquirieron utilizando dos microscopios diferentes: el Zeiss Apotome (campo amplio) y el Zeiss LSM780 (confocal), ambos disponibles en el Departamento de Microscopía del INB. Utilizamos objetivos con diversas resoluciones, incluyendo 10x, 25x y 40x. Es importante señalar que excluimos la resolución de 25x en el microscopio Apotome debido a problemas técnicos que afectaban su funcionamiento.

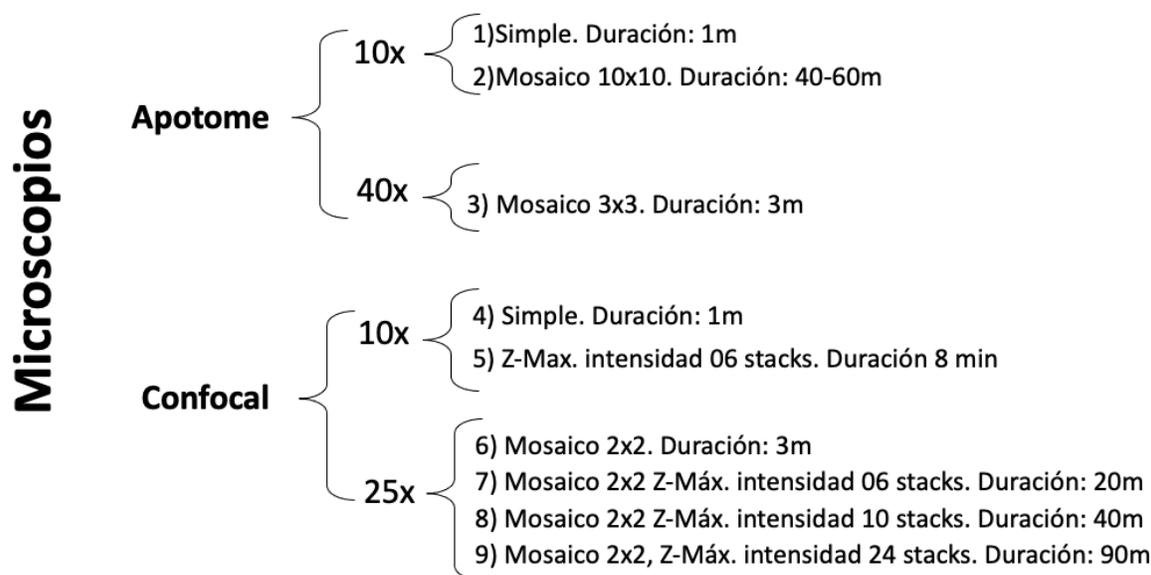


Figura 24: Esquema de las diferentes modalidades de adquisición para la captura de imágenes de microscopía.

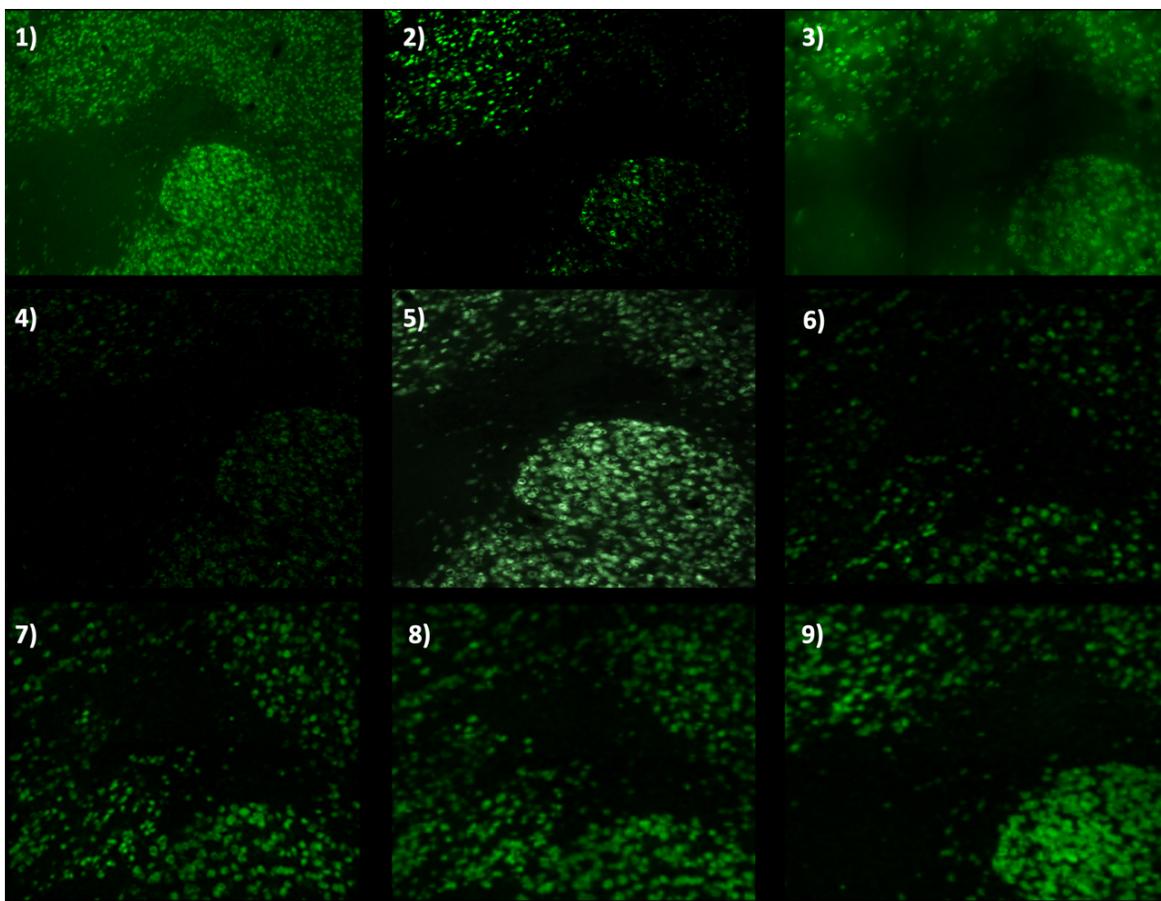


Figura 25: Ejemplo de Diferentes Modalidades de Adquisición de Imágenes. 1) Apotome, objetivo 10x; 2) Apotome, objetivo 10x, mosaico 10x10 (con extracción de la ROI para comparación); 3) Apotome, objetivo 40x; 4) Confocal, objetivo 10x; 5) Confocal, objetivo 10x, 06 stacks; 6) Confocal, objetivo 25x, mosaico 2x2, 01 stacks (ROI contralateral); 7) Confocal, objetivo 25x, mosaico 2x2, 06 stacks (ROI contralateral); 8) Confocal, objetivo 25x, mosaico 2x2, 10 stacks (ROI contralateral); 9) Confocal, objetivo 25x, mosaico 2x2, 24 stacks.

Posteriormente, se tomó la imagen de mejor resolución, confocal objetivo 25x, mosaico 2x2, 24 stacks, y se procesó de 8 maneras diferentes empleando diferentes métodos de *threshold* y de conteo automatizado que se encuentran en el software ImageJ (consultar Figura 26). Se analizaron los resultados y se eligieron los 4 mejores métodos, los cuales fueron: Test4: *threshold* Phansalkar, segmentación por *Watershed* y conteo por *Analyze particle*; Test6: *threshold* Binary, segmentación por *Watershed* y conteo por *Analyze particle*, Test7 conteo por 3D *object counter* (este método se mantuvo para comparar metodologías), Test8 *threshold* Binary, segmentación por *Watershed* y conteo por 3D *object counter*. Se mantuvo el Test0 (conteo manual) como referencia. Se observó que en sí, la implementación de la segmentación por *watershed* mejoraba el margen de error cometido por los métodos de *threshold* por sí solos.

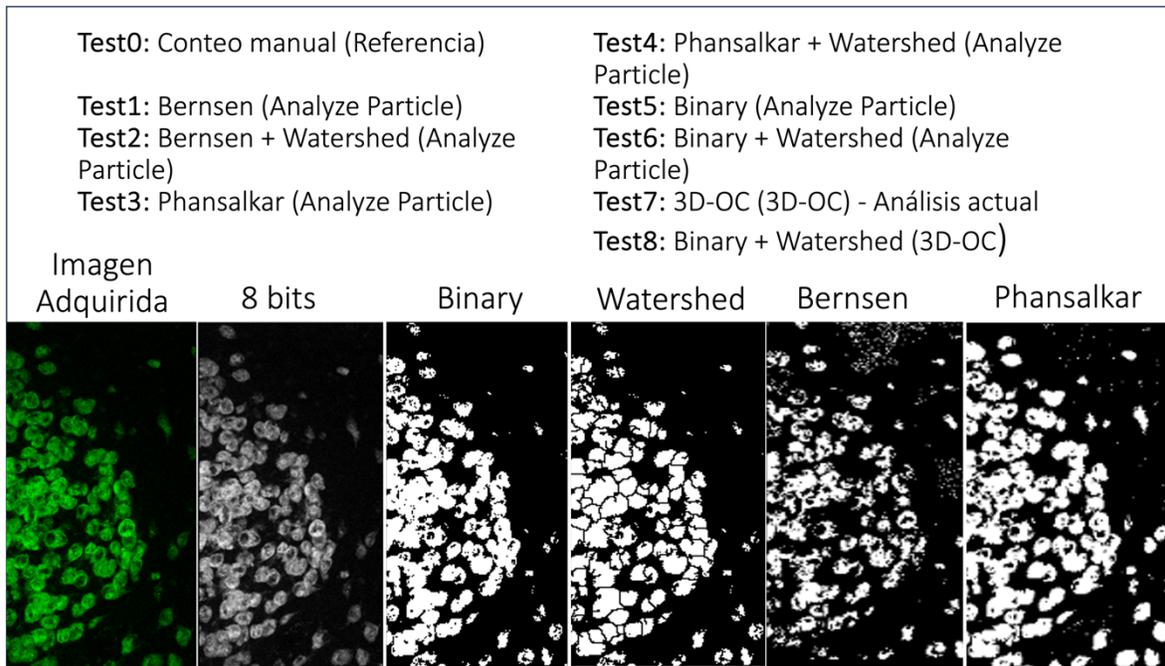


Figura 26: Métodos de *threshold* y tipos de conteo.

Test	Resultado	Error Absoluto	Error Relativo
Test0: Contar manualmente:	142	NA	NA
Test1: Bernsen (Analyze Particle)	97	45	0.3
Test2: Bernsen + Watershed (Analyze Particle)	171	29	0.2
Test3: Phansalkar (Analyze Particle)	67	75	0.52
Test4: Phansalkar + Watershed (Analyze Particle)	163	21	0.14
Test5: Binary (Analyze Particle)	45	97	0.68
Test6: Binary + Watershed (Analyze Particle)	141	1	0.007
Test7: 3D-OC (3D-OC) - Análisis actual	38	104	0.73
Test8: Binary + Watershed (3D-OC)	124	18	0.12

Tabla 7: Resultados de los diferentes métodos de conteo automatizado. La imagen utilizada fue de microscopio confocal Leica LSM780, mosaico 2x2, máxima intensidad 24 stack.

Para optimizar el tiempo, se emplearon los métodos que consiguieron mejores resultados (ver Figura 26 y Tabla 6) a las imágenes diferentes modalidades de adquisición de imágenes tomadas en cuenta en la Figura 25.

Microscopio	Modalidad	Contador	Valor	Error absoluto	Error relativo
Apotome	O10x	T0	168	NA	NA
Apotome	O10x	T4	197	-29	-0.172619
Apotome	O10x	T6	130	38	0.22619048
Apotome	O10x	T7	28	140	0.83333333
Apotome	O10x	T8	130	38	0.22619048
Apotome	O10x_m10x10	T0	75	NA	NA
Apotome	O10x_m10x10	T4	117	-42	-0.56
Apotome	O10x_m10x10	T6	49	26	0.34666667
Apotome	O10x_m10x10	T7	43	32	0.42666667
Apotome	O10x_m10x10	T8	49	26	0.34666667
Apotome	O40x_m5x5	T0	77	NA	NA
Apotome	O40x_m5x5	T4	869	-792	-10.285714
Apotome	O40x_m5x5	T6	318	-241	-3.1298701
Apotome	O40x_m5x5	T7	48	29	0.37662338
Apotome	O40x_m5x5	T8	318	-241	-3.1298701
Confocal	O10x	T0	98	NA	NA
Confocal	O10x	T4	95	3	0.03061224
Confocal	O10x	T6	87	11	0.1122449
Confocal	O10x	T7	1	97	0.98979592
Confocal	O10x	T8	87	11	0.1122449
Confocal	O10x_MI06	T0	104	NA	NA
Confocal	O10x_MI06	T4	97	5	0.04807692
Confocal	O10x_MI06	T6	102	2	0.01923077
Confocal	O10x_MI06	T7	36	68	0.66666667
Confocal	O10x_MI06	T8	117	-13	-0.125
Confocal	O25x_m2x2	T0	50	NA	NA
Confocal	O25x_m2x2	T4	87	17	0.16346154
Confocal	O25x_m2x2	T6	52	52	0.5
Confocal	O25x_m2x2	T7	39	65	0.625
Confocal	O25x_m2x2	T8	83	21	0.20192308
Confocal	O25x_m2x2MI24	T0	142	NA	NA
Confocal	O25x_m2x2MI24	T4	163	21	0.14
Confocal	O25x_m2x2MI24	T6	141	1	0.007
Confocal	O25x_m2x2MI24	T7	38	104	0.73
Confocal	O25x_m2x2MI24	T8	124	18	0.12
Confocal	O25x_m2x2MI10	T0	117	NA	NA
Confocal	O25x_m2x2MI10	T4	130	12	0.08450704
Confocal	O25x_m2x2MI10	T6	119	23	0.16197183
Confocal	O25x_m2x2MI10	T7	55	87	0.61267606
Confocal	O25x_m2x2MI10	T8	109	33	0.23239437

Confocal	O25x_m2x2MI06	T0	55	NA	NA
Confocal	O25x_m2x2MI07	T4	58	59	0.5042735
Confocal	O25x_m2x2MI08	T6	47	70	0.5982906
Confocal	O25x_m2x2MI09	T7	35	82	0.7008547
Confocal	O25x_m2x2MI10	T8	44	73	0.62393162

Tabla 8: Resultados del experimento del conteo automatizado de las imágenes de microscopía. Realizado con las diversas modalidades de adquisición de imágenes. O: objetivo; m: mosaico; MI: máxima Intensidad.

ANEXO V: Estudio Histológico Avanzado y Análisis de Morfología

Además del conteo celular, es crucial destacar que el análisis morfológico puede proporcionar una comprensión más profunda de los procesos histológicos en curso. Sin embargo, su aplicación conlleva desafíos notables. Para comenzar, la captura de imágenes de alta resolución con mayores aumentos, específicamente en la escala de 40x o incluso 100x, exige un tiempo considerable para la adquisición de datos. Además, una vez obtenidas estas imágenes, el análisis morfológico demanda un período prolongado para su procesamiento.

Una de las limitaciones más críticas de este enfoque se relaciona con la selección de células dentro de la muestra, que a menudo se realiza de manera manual utilizando el método tradicional de ImageJ. Este procedimiento manual puede ser propenso a sesgos y se vuelve aún más oneroso cuando se trata de analizar numerosas células en una región de interés. Sin embargo, para superar estas dificultades y aprovechar al máximo las imágenes obtenidas, decidimos explorar una solución innovadora: el desarrollo de un algoritmo personalizado utilizando el lenguaje de programación Python. Este algoritmo se basa en el principio del adelgazamiento según los patrones de Zhan (1984), similar al enfoque de ImageJ conocido como "skeletonize".

Una de las ventajas más significativas de la implementación de Python radica en su capacidad para identificar automáticamente todas las células presentes en las imágenes en lugar de requerir una selección manual individual. Este enfoque automatizado optimiza drásticamente el proceso de análisis, reduciendo tanto el tiempo necesario como el riesgo de sesgos. Cabe destacar que esta automatización permite el examen simultáneo de todas las células en la muestra (consultar Figura 21), lo que aumenta aún más la eficiencia del análisis.

Este enfoque innovador representa una mejora sustancial en términos de eficiencia y precisión en la evaluación de diversas morfologías en un mismo microambiente. Al implementar este procedimiento en el análisis de imágenes en proyectos de investigación, nos acerca a una comprensión más precisa de los procesos inflamatorios que tienen lugar en cada Región de Interés (ROI). Además, esta técnica puede combinarse con otros métodos, como Western blot, para explorar y establecer correlaciones entre las morfologías observadas y los fenotipos celulares subyacentes.

En resumen, la adopción de este enfoque basado en Python no solo mejora la eficiencia en la caracterización de procesos inflamatorios a través de un análisis exhaustivo de la morfología de la mayoría de células, sino que también reduce la necesidad de realizar la caracterización manual tradicional, que consume una cantidad significativa de tiempo y esfuerzo, especialmente cuando se trata de analizar una gran cantidad de células en cada región como lo es en los casos en que existen procesos inflamatorios.

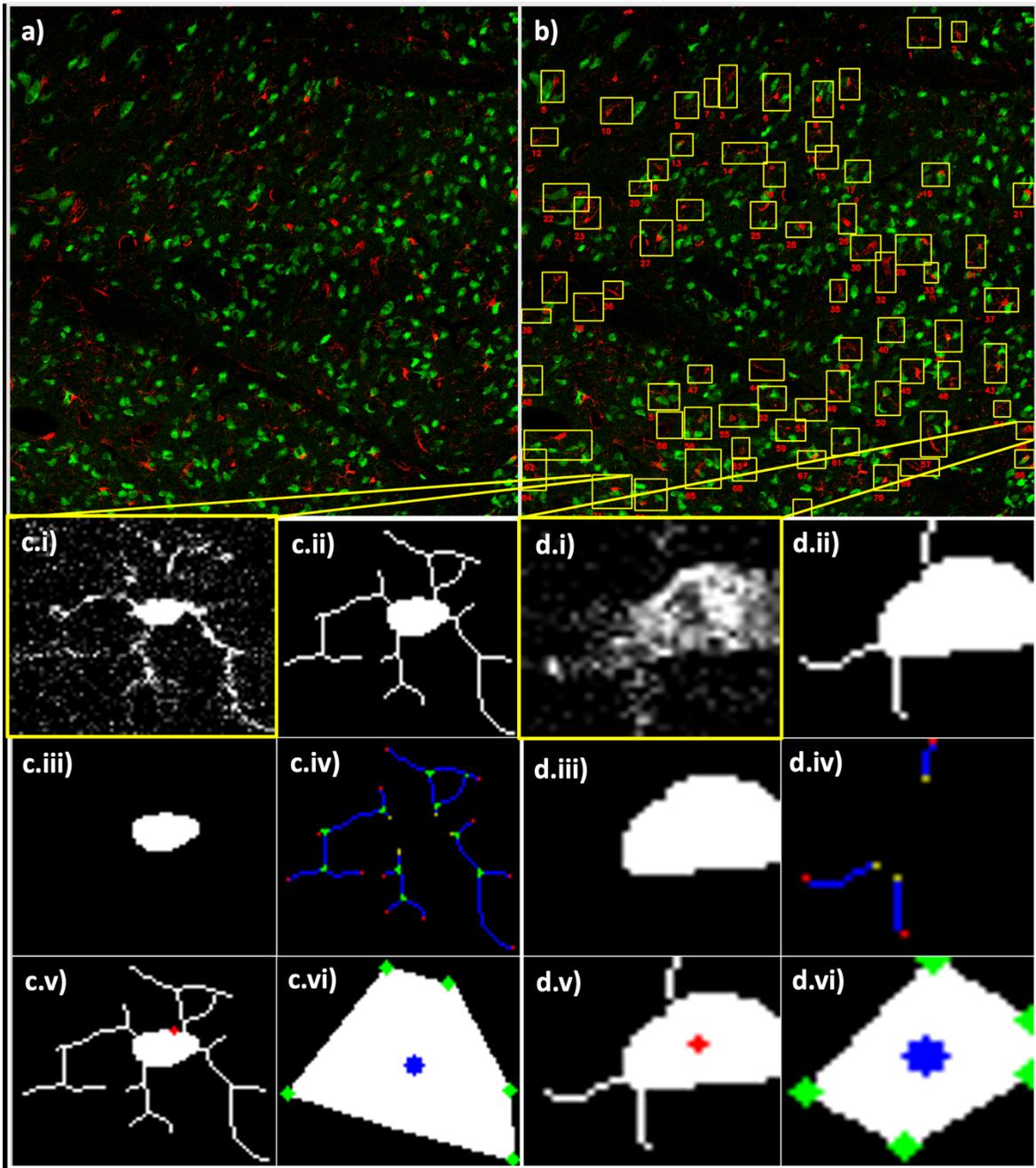


Figura 21 expandida: Análisis Morfológico. a) Imagen capturada mediante microscopio confocal a 40x de aumento; b) Detección automatizada de microglía; c y d) Ejemplo de procesamiento de la microglía; c.i y d.i) obtención de célula individual; c.ii y d.ii) esqueleto de la célula con conservación del soma; c.iii y d.iii) aislamiento del núcleo, esto nos permite hacer evaluación de perímetro y área (primer algoritmo); c.iv y d.iv) esqueleto de las ramificaciones sin tomar en cuenta el soma celular a diferencia del skeletonize tradicional (segundo algoritmo), la evaluación de las ramificaciones no considere al soma (se ejemplifica mejor en d.ii). se generan los puntos finales (rojo), ramificaciones (azul), puntos de conexión (verde) y, a diferencia del skeletonize tradicional, se consideran los puntos iniciales (amarillos), los cuales detectan las ramificaciones que parten del soma celular.; c.v y d.v) centroide de la célula; c.vi y d.vi) centroide del polígono. v y vi se utilizan para considerar el algoritmo de convex hull y así poder implementar los tres algoritmos en un solo análisis para realizar un análisis de la morfología más completo.

ANEXO VI: Estudio de Imágenes de Resonancia Magnética Ponderadas por Difusión

Debido a la evidente infiltración de microglía en la sustancia blanca en PCM y en las regiones del cerebelo según los estudios de histología, se optó por emplear la resonancia magnética por difusión (dMRI) para investigar el posible daño axonal.

La dMRI es una técnica de imagen que se basa en el movimiento Browniano de las moléculas de agua para interpretar la microestructura de los tejidos (120). El movimiento Browniano (BM) se refiere al movimiento aleatorio de partículas suspendidas en un fluido o gas. Este movimiento es ocasionado por la colisión de las moléculas suspendidas con las moléculas del medio circundante. Las fuerzas aleatorias actuando sobre las partículas pueden ser modeladas mediante ecuaciones diferenciales para describir el BM. Por medio de la teoría de procesos estocásticos y la probabilidad, es posible modelar el BM (120).

El movimiento de un conjunto de partículas, conocido como difusioforesis, puede ser descrito mediante la ley de Fick ($J = -D \nabla C$), la cual establece la difusión o el flujo de partículas (J) en términos del gradiente de concentración (∇C) y el coeficiente de difusión browniano (D). El valor de D está relacionado con propiedades intrínsecas de las partículas (por ejemplo, la energía térmica [k] y el radio [r] de la partícula), así como con propiedades del entorno (como la temperatura [T] y la viscosidad [η]), de acuerdo con la relación de Stokes-Einstein, bajo la suposición de un régimen de bajo número de Reynolds. En consecuencia, ya que la difusión está vinculada al movimiento de las partículas y su entorno, su evaluación nos proporciona información sobre la microestructura del tejido por el cual el agua circula (120, 121).

La dMRI aprovecha el hecho de que el agua es un componente esencial de los tejidos orgánicos. Aunque el agua puede moverse de manera aleatoria en todas las direcciones (isotrópica), en los tejidos biológicos, su movimiento se encuentra restringido por la microestructura (anisotrópica). Por ejemplo, las moléculas de agua que fluyen a lo largo de un axón se encuentran limitadas por sus barreras físicas (como la membrana axonal), por lo que el movimiento es anisotrópico, con un desplazamiento mayor a lo largo del axón en comparación con el desplazamiento transversal. En consecuencia, la dMRI emplea campos magnéticos con gradientes sensibles a la difusión durante el escaneo, para evaluar cómo se desplazan las moléculas de agua debido al BM en cada voxel de la imagen (120, 121).

Para llevar a cabo la evaluación del movimiento del agua mediante dMRI, se adquieren una serie de imágenes ponderadas por difusión (DWI) utilizando diversos gradientes magnéticos. Para caracterizar la orientación del movimiento de difusión en tres dimensiones, es necesario aplicar los gradientes de difusión en al menos seis orientaciones no colineales. Luego, la cantidad de difusión en cada voxel se cuantifica calculando la tasa de difusión en cada una de las direcciones de los gradientes (120).

Existen diferentes modelos de difusión, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. Estos difieren en el número y la orientación de los gradientes de difusión, así como en el modelo matemático utilizado para analizar los datos. Los modelos más comunes incluyen la

imagen del tensor de difusión (DTI), la imagen de kurtosis de difusión (DKI), la imagen de dispersión y densidad de orientación de neuritas (NODDI), la deconvolución esférica condicional (CSD) y el modelo estándar (121).

A diferencia de DTI, DKI puede proporcionar una evaluación más precisa de los cambios cerebrales relacionados con el consumo de alcohol (119). Estudios han indicado que la kurtosis media (MK) es la medida más sensible para evaluar estos cambios. Por lo tanto, se está explorando la posibilidad de realizar un análisis basado en regiones de interés (ROIs) para evaluar los daños causados por el alcohol en estas áreas utilizando la difusión (consultar Figura 22). Hasta el momento, se cuenta con información de 16 ratas (4 en el grupo control, 12 en el grupo EtOH).

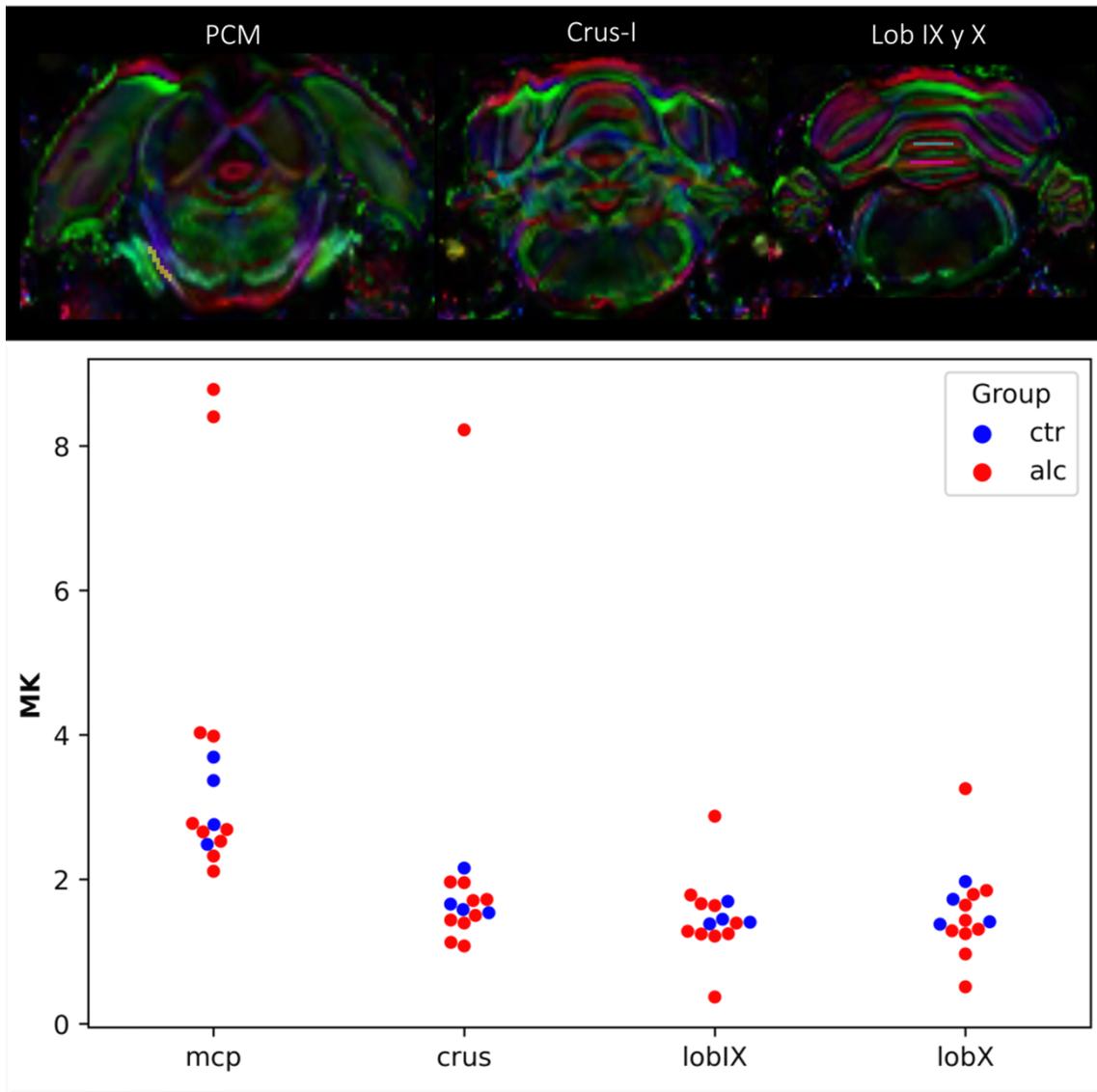


Figura 22 Análisis basado en regiones de interés y distribución de la kurtosis media en las regiones de interés. PCM: pedúnculo cerebeloso medio; Crus-I del cerebelo; Lob: lóbulo IX y X del cerebelo.

Una vez que se seleccionó la Región de Interés (ROI), se procedió a evaluar la kurtosis media (MK), donde se observa una tendencia al aumento de la MK en el PCM y una tendencia a la disminución de la MK en los Lóbulos IX y X del Cerebelo (consultar Figura 22).

Se ha documentado que la kurtosis media (MK) es una medida particularmente sensible a los cambios microestructurales en esta patología. Se ha observado que, en casos de exposición al alcohol, la MK tiende a aumentar debido a la necrosis neuronal, el estrés oxidativo, la gliosis y la infiltración de células inflamatorias (119). Por otro lado, la disminución de la MK puede estar relacionada con varios factores, como 1) alteraciones en el metabolismo energético de las células, 2) producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el consiguiente daño a las membranas celulares, y 3) respuestas inmunológicas (119). Estos factores combinados pueden llevar a la pérdida de mielina, lo que a su vez reduce la restricción estructural al movimiento del agua y resulta en una disminución de la MK (119).

Resulta interesante que, al igual que en el análisis de morfometría (DBM), el análisis de la difusión también parece arrojar resultados contrastantes entre el PCM y el cerebelo. Cabe resaltar que en el PCM se observa una tendencia al aumento de la MK, lo cual concuerda con la literatura que reporta infiltración de células gliales, una característica que es visible en los estudios histológicos. En cambio, en el cerebelo, se observa una tendencia a la disminución de la MK en la sustancia blanca, lo que se ha asociado con la desmielinización. Aunque la ausencia de un marcador específico de mielina limita nuestras conclusiones sobre este aspecto, la infiltración de procesos microgliales en regiones de sustancia blanca en casos de exposición al alcohol, pero no en los controles, sugiere una afectación en las vainas de mielina.

Es importante tener presente que se observó una heterogeneidad en los efectos en los cortes histológicos, lo que podría influir en las tendencias analizadas en el estudio de difusión, de manera similar a lo observado en el DBM. Además, para obtener conclusiones más sólidas, se requiere un tamaño de muestra mayor en el análisis de difusión, así como la incorporación de más marcadores en los estudios de inmunofluorescencia para continuar estudiando este fenómeno.

ANEXO VII: Estudio de Órganos Periféricos y su Impacto en la Patogenia

Dada la evidente implicación de los vasos sanguíneos (ver Discusión: correlato histológico) y los efectos del alcohol en el metabolismo (según se detalló en el marco teórico), se decidió profundizar en la exploración de los efectos del alcohol en órganos periféricos. Para este propósito, se optó por examinar los efectos en el hígado, el órgano periférico más comúnmente afectado por el alcohol, y el bazo, debido a su doble papel como filtro sanguíneo y componente del sistema linfático.

Enfermedad Hepática Alcohólica

El alcohol ejerce efectos perjudiciales en diversos órganos. Uno de los órganos más impactados es el hígado. La enfermedad hepática alcohólica comprende una serie de alteraciones tanto a nivel macroscópico como microscópico en el hígado, las cuales resultan de un consumo regular de alcohol. Este espectro de daño hepático puede abarcar desde la esteatosis alcohólica (reversible) y la hepatitis alcohólica o esteatohepatitis, hasta la cirrosis alcohólica (fibrosis; irreversible; 126-130).

a) Esteatosis alcohólica

En la fisiología hepática normal del metabolismo lipídico, los hepatocitos reciben ácidos grasos para oxidarlos y usarlos como fuente de energía o almacenarlos en forma de triglicéridos. Estos triglicéridos pueden ser transportados como partículas de VLDL o almacenados en forma de gotas lipídicas en los hepatocitos por un tiempo determinado. Sin embargo, la acumulación excesiva de estas gotas lipídicas puede resultar en daño celular. La "esteatosis alcohólica" se refiere a la acumulación anormal de mono-/di-/triglicéridos y ácidos grasos en forma de gotas en los hepatocitos. Por lo general, este proceso comienza en la Zona 3 perivenular/centrolobulillar y progresa hacia la Zona 1 periportal. Inicialmente, se manifiesta con pequeñas gotas de grasa en el citoplasma (microvesiculares). A medida que la acumulación continua, se forman gotas de mayor tamaño (macrovesiculares) que pueden empujar el núcleo hacia la periferia o incluso llevar a la ruptura celular, dando lugar a la formación de lipogranulomas o reacciones histiocíticas. Como se mencionó previamente, la oxidación del alcohol en el hígado consume moléculas de NADH, las cuales también son cruciales para la oxidación lipídica mitocondrial, lo que lleva a una competencia inhibitoria en la oxidación de lípidos. Además, se ha observado que el etanol puede tener un efecto hipertriglicéridémico al activar factores de transcripción como los SREBPs (*sterol response element binding proteins*; 127, 128).

Macroscópicamente, la esteatosis confiere un color amarillento al hígado y le otorga una sensación de "grasosidad" al tacto. Es importante señalar que la presencia de esteatosis no es esencial para el diagnóstico de enfermedad hepática alcohólica, ya que esta condición puede disminuir incluso cuando el consumo de alcohol persiste y la enfermedad progresa (126).

b) Esteatohepatitis alcohólica

La esteatohepatitis alcohólica se refiere a la presencia de daño hepático acompañado de esteatosis. Esto se evidencia en el cambio en la morfología del hepatocito, que adopta una

forma abombada, la presencia de neutrófilos en el parénquima lobular, y la aparición de apoptosis o cuerpos de Mallory. La forma abombada del hepatocito se debe a cambios osmóticos causados por la pérdida de ATP, el aumento del calcio intracelular y alteraciones en las redes de filamentos intermedios, lo que puede conducir a la necrosis oncolítica. Estas células tienden a tener una apariencia delicada, con bordes poco definidos en comparación con el entorno. La necrosis oncolítica es la principal forma de daño hepático en el contexto de esteatohepatitis. Además, los mecanismos de apoptosis también pueden ser desencadenados por el daño oxidativo, provocando alteraciones en las membranas mitocondriales internas. Estos hepatocitos apoptóticos suelen presentar contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación celular. La apoptosis es el principal mecanismo de daño hepático en enfermedades no alcohólicas. Otro hallazgo histológico característico son los cuerpos de Mallory-Denk, acumulaciones eosinofílicas en el citoplasma hepático con localización perinuclear. La inflamación lobular también es un mecanismo de lesión hepática, y en las enfermedades relacionadas con el alcohol, se caracteriza por una predominancia de neutrófilos que rodean los hepatocitos en forma de concha, fenómeno conocido como "satelitosis". Además, es común encontrar infiltración de linfocitos, mastocitos y eosinófilos en estas enfermedades. En general, estos cambios histológicos muestran una distribución inicial en la zona perivenular y, a medida que la enfermedad progresa, se extienden a lo largo de los lóbulos hepáticos (128-130).

c) **Fibrosis: Cirrosis alcohólica**

El proceso fibrótico en la enfermedad hepática alcohólica comienza en la zona 3, la región perivenular, y se extiende en un patrón pericelular/perisinusoidal, conocido como "alambrado de gallina". Las tinciones que mejor permiten identificar estos daños son el Tricrómico de Masson y el Rojo de Sirius. En estadios más avanzados, la fibrosis se expande hacia los tractos portales y centro-portales o porto-portales. Si el daño hepático por alcohol persiste, la combinación de fibrosis y regeneración hepática puede dar lugar a la formación de nódulos y a la cirrosis. En etapas tardías, la tinción de Orceína ayuda a distinguir entre las bandas anchas de fibrosis y las áreas de colapso debido a hepatitis alcohólica aguda.

Dado que el alcohol circula en sangre y ejerce efectos en forma REDOX, es plausible que afecte otros órganos. La elección del bazo se basó en su función crucial en la circulación sistémica como filtro de sangre y su papel en el sistema linfático. El bazo se compone de dos compartimentos con funciones y características morfológicas distintas: la pulpa roja y la pulpa blanca (122).

- **Pulpa Roja**

La pulpa roja está formada por mallas de cordones esplénicos y senos venosos. Los cordones esplénicos contienen fibras reticulares (constituidas por colágeno y fibras elásticas, microfibrillas, células reticulares de la lámina basal y fibras adrenérgicas no mielinizadas), células reticulares (miofibroblastos) y macrófagos asociados. Dentro de los cordones esplénicos se encuentran células sanguíneas (eritrocitos, granulocitos, monocitos).

- **Pulpa Blanca**

La pulpa blanca incluye la Vaina Periarteriolar Linfática (PALS, por sus siglas en inglés), los folículos y la zona marginal. Celularmente, esta zona contiene linfocitos, macrófagos, células

dendríticas, células plasmáticas, arteriolas y capilares. La PALS se divide en una parte interna, donde predominan los linfocitos T CD4+ y CD8+ y que tiende a teñirse un poco más que la parte externa de la PALS, donde predominan linfocitos B y T pequeños, así como macrófagos. Es en esta región donde ocurre la formación de células plasmáticas. Los folículos, que son continuaciones de la PALS, suelen encontrarse en las bifurcaciones de las arteriolas centrales. Están compuestos principalmente por células B, células dendríticas foliculares y linfocitos T CD4+. La zona marginal, un área única del bazo ubicada entre la pulpa roja, la PALS y los folículos, está conformada por macrófagos metalofílicos y senos marginales. Estos macrófagos son importantes porque expresan numerosos receptores de reconocimiento de patrones, como TLRs y MARCO, que desempeñan un papel fundamental en la captura de bacterias y virus.

Relación del Bazo con el consumo crónico de alcohol

Numerosos estudios han buscado establecer correlaciones microestructurales en el bazo en relación con el estadio de pacientes con consumo crónico de alcohol. Amrik (1987) demostró que el etanol provoca la disminución de células linfoides en el timo, el bazo y los nodos linfáticos, generando cambios en la presentación de antígenos en los esplenocitos, alteraciones en la producción de citocinas, inhibición en la proliferación de linfocitos T, supresión de la respuesta de anticuerpos primarios, apoptosis de macrófagos y activación esplénica de células natural killer. Además, se informó que el efecto apoptótico del etanol es más pronunciado en las células B que en las células T (122).

Por su parte, Corazza (1997) identificó que el alcoholismo conlleva a alteraciones en los mecanismos celulares y humorales de la inmunidad. Corazza sugirió que la hipofunción del bazo podría resultar en una disminución en la opsonización de IgM y un cambio alterado en la producción de IgM a IgG. De esta manera, el aumento de infecciones en pacientes alcohólicos podría estar asociado más con la hipofunción del bazo que con la enfermedad hepática en sí. Además, el alcohol altera las funciones de las células de Kupffer, lo que podría resultar en un efecto sinérgico en contra del sistema inmunológico. Sin embargo, no se ha confirmado que el alcohol sea la causa directa del hipoesplenismo. Por lo tanto, la malnutrición que comúnmente acompaña a los pacientes con alcoholismo podría ser la verdadera causa de los efectos negativos en la función del sistema reticuloendotelial (123).

Mirela Budek (2000) sugirió que, dado que los folículos del bazo consisten en células B en estado basal, una disminución en la densidad y el diámetro de los folículos en ratas tratadas agudamente con etanol podría indicar una pérdida de células B. Además, como el etanol es un agente químico que induce apoptosis en el bazo, podría provocar la liberación de glucocorticoides endógenos. Esta liberación de glucocorticoides podría estar relacionada con los cambios en los folículos del bazo debido a los niveles incrementados de ACTH y corticosterona después del tratamiento con alcohol (125).

En el estudio de Kashani (2015), se intentó establecer una relación entre el tamaño del bazo medido por sonografía y/o tomografía y su diagnóstico o pronóstico en la cirrosis alcohólica. Se encontró que los pacientes con enfermedades alcohólicas presentaban un bazo de menor tamaño en comparación con otras enfermedades hepáticas no alcohólicas (como hepatitis C y esteatosis hepática no alcohólica). Además, se observó que el volumen del bazo en

pacientes alcohólicos era menor que en pacientes no alcohólicos, y que el diámetro craneocaudal del bazo en pacientes con enfermedades hepáticas era significativamente menor que en aquellos sin consumo de alcohol (124).

En resumen, se han descrito anomalías en la inmunidad tanto a nivel celular como humoral, incluyendo un aumento en las inmunoglobulinas policlonales, la circulación de complejos inmunes y el depósito de estos complejos, una disminución de las células inmunes a medida que aumentan las concentraciones de etanol, y una reducción en la capacidad lítica de los esplenocitos. Sin embargo, es complicado determinar si estas anomalías son resultado de un efecto directo del alcohol y/o acetaldehído en el sistema inmunológico, o si son consecuencia de un estado de enfermedad (como la enfermedad hepática) provocado por el consumo crónico de alcohol y/o asociado a una dieta deficiente.

Basado en este marco teórico, se iniciaron estudios histológicos en el hígado y el bazo en sujetos controles y experimentales con el modelo de IA2BC previamente mencionado (ver Figura 1). A simple observación macroscópica, se puede apreciar una cicatriz en el hígado de la rata expuesta al alcohol (rata 125; ver Figura 24).

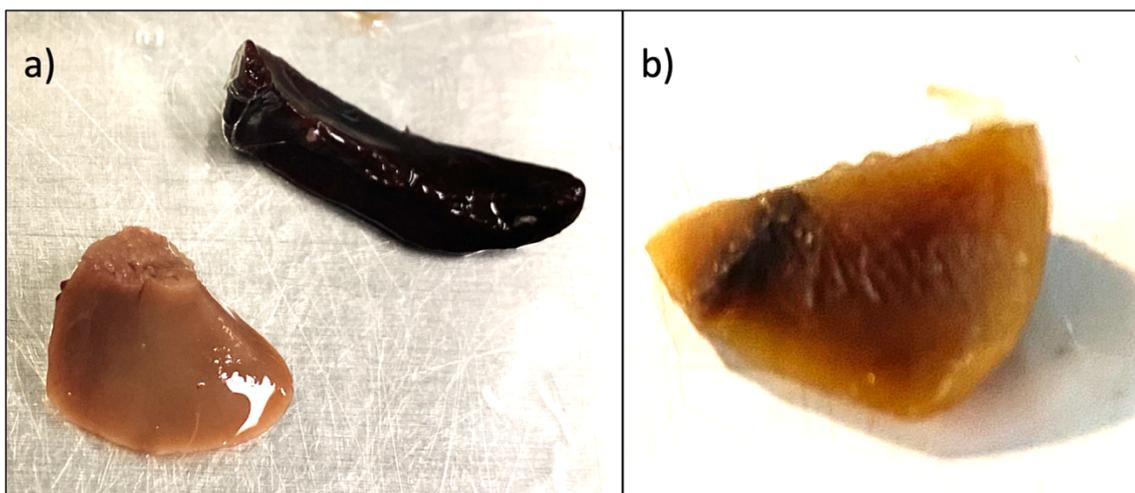


Figura 27: Imágenes de Órganos Disecados - Hígado y Bazo. a) Vista de la parte posterior del bazo y el lóbulo cuadrado del hígado en ratas de control. b) Macrofotografía que muestra una cicatriz en el hígado en la cara interna de una rata expuesta al alcohol. No se observaron diferencias macroscópicas en los bazos de las ratas expuestas a alcohol.

Luego de la inclusión en parafina, el tejido fue seccionado en láminas de 10 micras de espesor y posteriormente sometido a las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HyE) y Tricrómico de Masson. Las imágenes fueron capturadas utilizando objetivos de aumento 4x, 10x, 40x y 100x en el microscopio Leica DM 500 de la unidad de microscopía del Instituto de la UNAM, campus Juriquilla.

Los hallazgos microscópicos en el hígado, observados a través de la tinción de Hematoxilina y Eosina, mostraron una infiltración de neutrófilos, pérdida de la definición de los núcleos, presencia de microvesículas lipídicas intracitoplasmáticas (indicativas de esteatosis) y macrófagos multinucleados (indicadores de esteatohepatitis; ver Figura 25; 126-130). De manera similar, la tinción de Tricrómico de Masson en el hígado reveló infiltración de

neutrófilos, pérdida de definición de los núcleos, presencia de microvesículas lipídicas intracitoplasmáticas y macrófagos multinucleados (ver Figura 26).

En cuanto a los hallazgos microscópicos en el bazo, utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina, se pudo observar el traslapamiento de folículos, la pérdida de definición de los folículos, infiltrado eosinofílico en los folículos y el alargamiento del centro germinal (ver Figura 27). Por otro lado, al aplicar la tinción de Tricrómico de Masson en el bazo, se notó el traslapamiento de folículos, la pérdida de definición de los folículos, el alargamiento del centro germinal y la presencia de fibrosis alrededor de los centros germinales (ver Figura 28; 122-125).

Estos resultados histológicos resaltan las alteraciones en los tejidos observadas en relación con el consumo crónico de alcohol. La presencia de infiltrados, cambios en la morfología celular y la acumulación de microvesículas lipídicas son consistentes con los efectos adversos del alcohol en el hígado y el bazo. Estos hallazgos respaldan el marco teórico previamente discutido y proporcionan una base histológica para entender mejor los efectos patológicos inducidos por el alcohol en estos órganos.

Los resultados muestran evidentes cambios microestructurales en el grupo experimental sometido al modelo de acceso intermitente al alcohol. En el hígado, se observaron alteraciones distintas dependiendo de la tinción utilizada. La tinción de Tricrómico de Masson resaltó la presencia de daño por cirrosis alcohólica (fibrosis), caracterizada por el patrón típico de alambrado de gallina, que indica daño crónico. Este hallazgo concuerda con el modelo de alcohol establecido en este estudio. Por otro lado, la tinción de Hematoxilina y Eosina a aumentos más altos (40x y 100x) permitió visualizar daños relacionados con la esteatosis hepática (microvesículas), abalnamiento de hepatocitos, pérdida de definición de los hepatocitos, así como infiltrado de neutrófilos y macrófagos, indicativos de esteatohepatitis. Estos resultados reflejan la exposición prolongada que tuvo lugar durante los 100 días de seguimiento.

Es importante resaltar que aunque se encontraron hallazgos, no se presentó una esteatosis franca con macrovesículas en el grupo experimental, y la fibrosis en este grupo no fue tan extensa como se podría esperar. En el caso del bazo, la tinción de Hematoxilina y Eosina mostró cambios en la estructura, principalmente la pérdida de organización de las distintas estructuras y el alargamiento de los centros germinales, que hasta ahora no habían sido reportados en estudios anteriores. Asimismo, la tinción de Tricrómico de Masson evidenció la presencia de fibrosis alrededor de los centros germinales, otro hallazgo no reportado en investigaciones previas.

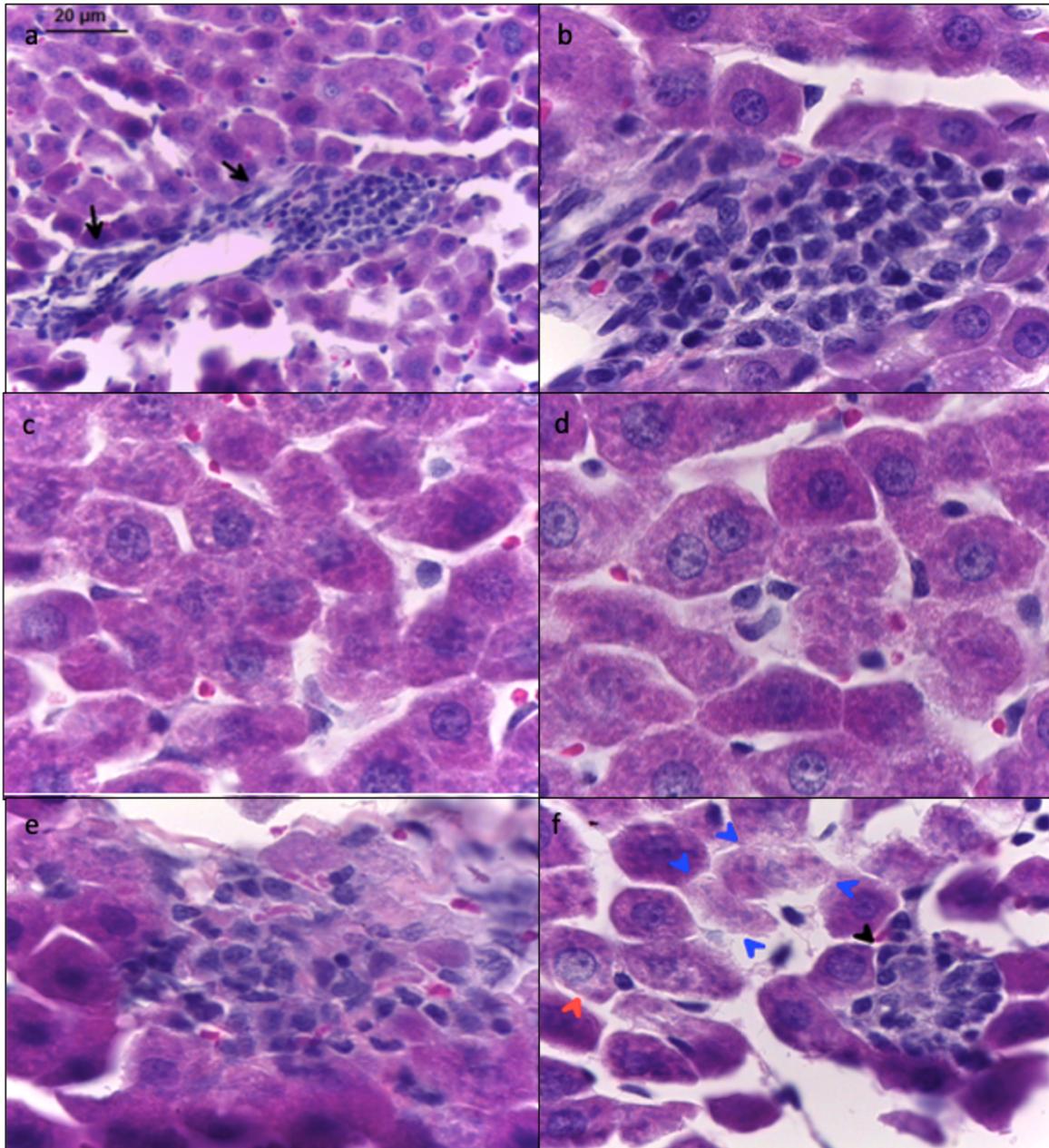


Figura 28: Tinción de Hematoxilina y Eosina en el Hígado del Grupo Experimental. a) Acumulación de Neutrófilos (40x). b) Misma imagen observada con un objetivo de 100x. c) Hepatocitos con núcleo poco definido, microvesículas lipídicas intracitoplasmáticas y bordes celulares poco definidos (100x). d) Hepatocitos con núcleo poco definido, microvesículas lipídicas intracitoplasmáticas y bordes celulares poco definidos (100x). e) Infiltración de neutrófilos (100x). f) Cabeza de flecha roja: microvesículas lipídicas indicativas de esteatosis hepática, cabeza de flecha negra: infiltración de neutrófilos indicativa de esteatohepatitis, cabezas de flechas azules: macrófagos multinucleados indicativos de esteatohepatitis (100x).

Figura 29: Tinción de Tricrómico de Masson en el Hígado del Grupo Experimental. a) Se visualiza fibrosis con un característico patrón de alambrado de gallina (40x). b, c y d) Muestra de fibrosis con patrón de alambrado de gallina, hepatocitos con bordes poco definidos y citoplasma heterogéneo (100x).

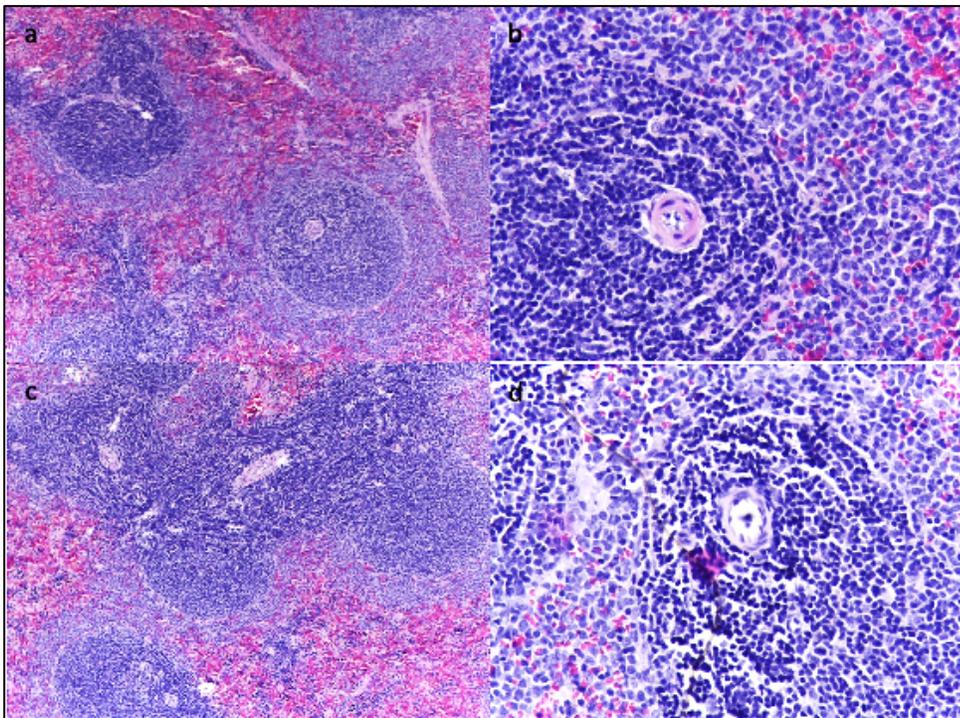
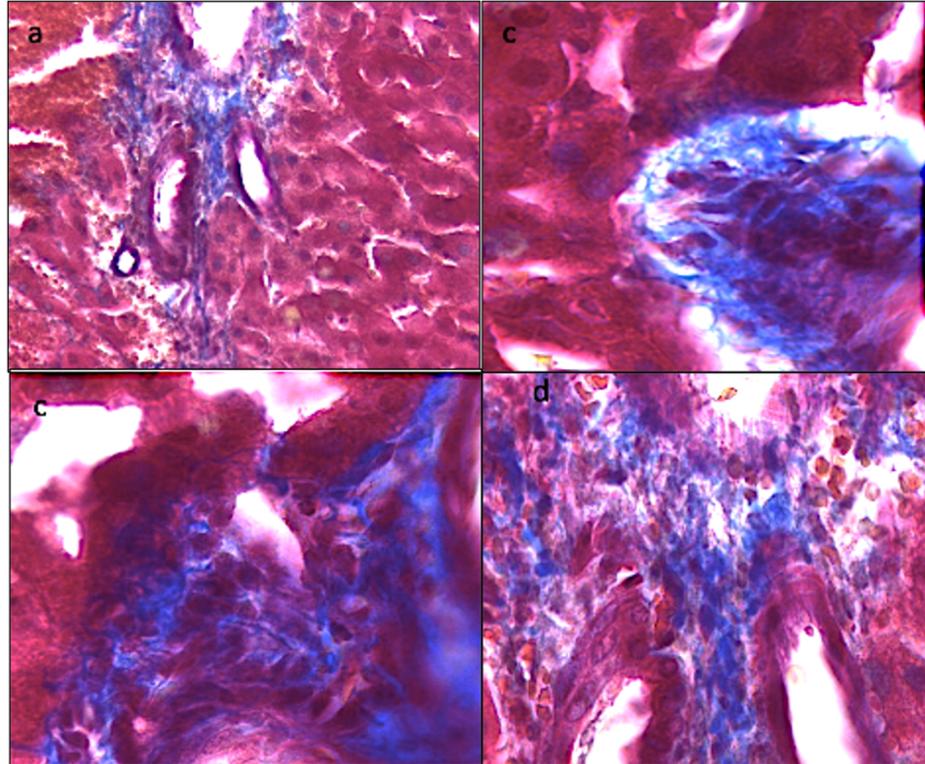


Figura 30: Tinción de Hematoxilina y Eosina en el Bazo. a) Grupo control, presenta folículos bien definidos y centros germinales redondeados (10x). b) Grupo control, muestra un folículo claramente delimitado. c) Grupo Experimental, evidencia superposición de folículos y elongación del centro germinal. d) Grupo Experimental, muestra pérdida de definición en el folículo y presencia de infiltrado eosinofílico.

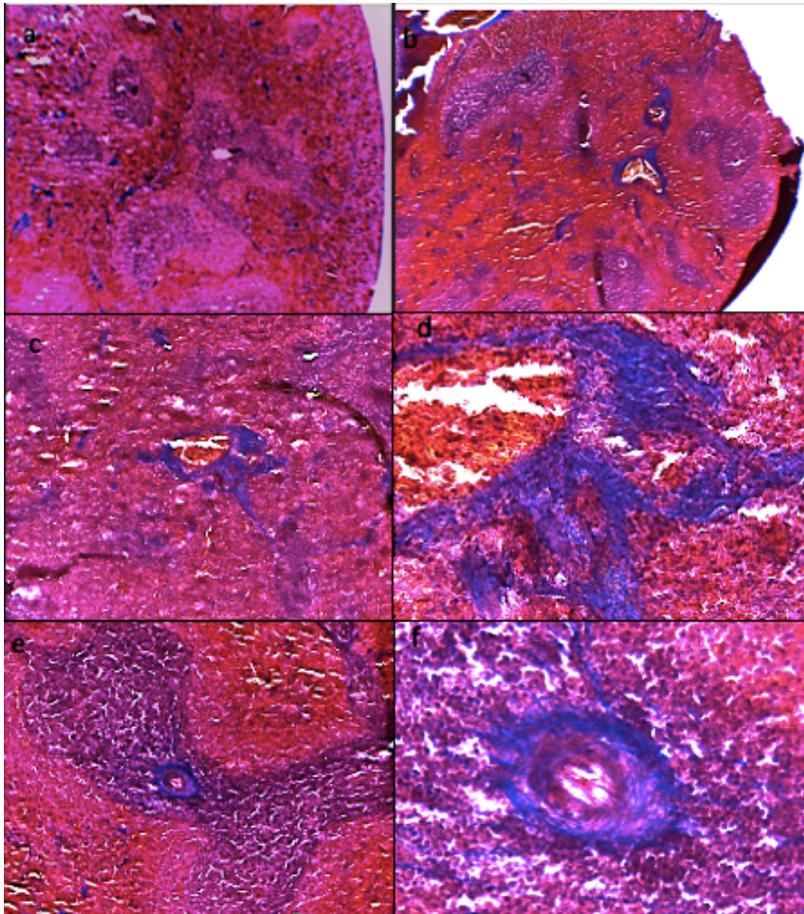


Figura 31: Tinción de Tricrómico de Masson en el Bazo del Grupo Experimental. a y b) Muestra con folículos mal definidos y superposición entre ellos (10x). c) Posible presencia de fibrosis (40x). d) Ampliación de la imagen con objetivo de 100x. e) Folículos que han perdido su forma redondeada característica, con un centro germinal rodeado de posible fibrosis (10x). f) Misma imagen con un aumento de 40x.

Este estudio introductorio, aunque basado en la teoría de la existencia de un sustrato biológico, pone en tela de juicio la idea de que esta enfermedad se limite a un solo órgano. A diferencia de algunas otras enfermedades que han sido estudiadas y tratadas desde una perspectiva unitaria, parece ser que los trastornos psiquiátricos tienen una etiología distribuida en el organismo en lugar de estar focalizada en un solo órgano. Esto se ejemplifica en los enfoques emergentes para otras patologías psiquiátricas, como la depresión, donde se propone una conexión intestino-cerebro que resalta el papel de los órganos periféricos como factores causales. Además, se plantea la posibilidad de que el alcohol, debido a su efecto proinflamatorio y a sus niveles de intoxicación relacionados con su concentración en sangre, tenga un impacto en el bazo, que actúa como un filtro sanguíneo y un órgano linfóide.

Se menciona la posibilidad de examinar otros órganos como el intestino delgado, específicamente las placas de Peyer y la mucosa, para identificar posibles contribuciones al fenómeno. En resumen, este estudio no busca establecer causalidad, sino cuestionar los enfoques actuales hacia los trastornos neuropsiquiátricos y promover la generación de nuevos biomarcadores. Dado el desafío que presenta el estudio del cerebro debido a su complejidad, se plantea la idea de que la tecnología actual puede no ser lo suficientemente específica o sensible para detectar este tipo de fenómenos conductuales con una entrada de datos provenientes de un único órgano. Se sugiere que la consideración de múltiples variables provenientes de órganos periféricos, combinadas con las del sistema nervioso central, podría acercarnos a una mejor predicción en estos casos.

Referencias

1. Koob, G. F., & Moal, M. L. (2005). *Neurobiology of Addiction (English Edition)* (1.^a ed.). Academic Press.
2. *ALCOHOL*. (2021). Etimologías de Chile - Diccionario que explica el origen de las palabras. <http://etimologias.dechile.net/?alcohol>
3. W.H.O. (1994). *Glosario de términos de alcohol y drogas*. Glosario de términos de alcohol y drogas. https://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf
4. Baler, R. D., & Volkow, N. D. (2006). Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. *Trends in Molecular Medicine*, 12(12), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.005>
5. Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2009). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
6. Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(16)00104-8)
7. Koob, G. F. (2008). A Role for Brain Stress Systems in Addiction. *Neuron*, 59(1), 11–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.012>
8. Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 363–371. <https://doi.org/10.1056/nejmra1511480>
9. Li, M. D., & Burmeister, M. (2009). New insights into the genetics of addiction. *Nature Reviews Genetics*, 10(4), 225–231. <https://doi.org/10.1038/nrg2536>
10. Volkow, N. D., & Koob, G. (2015). Brain disease model of addiction: why is it so controversial? *The Lancet Psychiatry*, 2(8), 677–679. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(15\)00236-9](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(15)00236-9)
11. *The Brain Disease Model of Addiction | Hazelden Betty Ford*. (s. f.). <https://www.hazeldenbettyford.org/research-studies/addiction-research/brain-disease-model#:~:text=The%20Brain%20Disease%20Model%20of%20Addiction%20Explained&text=Drugs%20can%20alter%20important%20brain,drug%20use%20that%20marks%20addiction.&text=Addiction%20can%20be%20described%20as%20a%20repeating%20cycle%20with%20three%20stages.>
12. Namba, M. D., Tomek, S. E., Olive, M. F., Beckmann, J. S., & Gipson, C. D. (2018). The Winding Road to Relapse: Forging a New Understanding of Cue-Induced Reinstatement Models and Their Associated Neural Mechanisms. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00017>
13. Tiffany, S. T., & Carter, B. L. (1998). Is craving the source of compulsive drug use? *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 23–30. <https://doi.org/10.1177/026988119801200104>
14. Wadley, G. (2016). How psychoactive drugs shape human culture: A multi-disciplinary perspective. *Brain Research Bulletin*, 126, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.008>
15. Gilpin, N., & Koob, G. (2008). Neurobiology of Alcohol Dependence: focus on motivational mechanism. *Alcohol Research & Health*, 31(3), 185–195. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19881886/>
16. Erdozain, A., & Callado, L. (2014). Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones*, 26(3), 360–370. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
17. Ravindran, C. R. M., & Ticku, M. K. (2006). Tyrosine Kinase Phosphorylation of GABAA Receptor $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ Subunits Following Chronic Intermittent Ethanol (CIE) Exposure of Cultured Cortical Neurons of Mice. *Neurochemical Research*, 31(9), 1111–1118. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9124-9>
18. Silvers, J. M., Tokunaga, S., Mittleman, G., & Matthews, D. B. (2003). Chronic Intermittent Injections of High-Dose Ethanol During Adolescence Produce Metabolic, Hypnotic, and Cognitive Tolerance in Rats. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 27(10), 1606–1612. <https://doi.org/10.1097/01.ac.0000090141.66526.22>
19. Paquot, N. (2019). Le métabolisme de l'alcool. *Revue Médical de Liege*, 74(5–6), 265–267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31206264/>
20. Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>
21. Zakhari, S. (2006). Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol research & Health*, 29(4), 245–255. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527027/#:~:text=Ethanol%20is%20nonoxidatively%20metabolized%20by,phospholipid%20known%20as%20phosphatidyl%20ethanol.>
22. Ron, D., & Messing, R. (2013). Signaling Pathways Mediating Alcohol Effects. *Curr Top Behav Neurosci.*, 13, 87–126. https://doi.org/10.1007/7854_2011_161
23. Hipolito, L., Sanchez, M., Polache, A., & Granero, L. (2007). Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update. *Current Drug Metabolism*, 8(7), 716–727. <https://doi.org/10.2174/138920007782109797>
24. Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism*, 14(6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
25. Papa, M., de Luca, C., Petta, F., Alberghina, L., & Cirillo, G. (2014). Astrocyte–neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 42, 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.010>
26. Miguel-Hidalgo, J. J. (2018). Molecular Neuropathology of Astrocytes and Oligodendrocytes in Alcohol Use Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00078>

27. Koob, G. F. (2008). A Role for Brain Stress Systems in Addiction. *Neuron*, 59(1), 11-34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.012>
28. Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V., & Liddelow, S. A. (2021). Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity*, 54(2), 211-224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.013>
29. Papa, M., De Luca, C., Petta, F., Alberghina, L., & Cirillo, G. (2014). Astrocyte–neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 42, 35-54. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.010>
30. Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427-434. <https://doi.org/10.1002/glia.20207>
31. Goodlett, C. R., Leo, J. T., O'Callaghan, J. P., Mahoney, J. C., & West, J. R. (1993). Transient cortical astrogliosis induced by alcohol exposure during the neonatal brain growth spurt in rats. *Developmental Brain Research*, 72(1), 85-97. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90162-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90162-4)
32. Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V., & Liddelow, S. A. (2021). Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity*, 54(2), 211-224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.013>
33. Verkhatsky, A., Matteoli, M., Parpura, V., Mothet, J., & Zorec, R. (2016). Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *The EMBO Journal*, 35(3), 239-257. <https://doi.org/10.15252/embj.201592705>
34. Hipolito, L., Sanchez, M., Polache, A., & Granero, L. (2007). Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update. *Current Drug Metabolism*, 8(7), 716-727. <https://doi.org/10.2174/138920007782109797>
35. Dringen, R., Brandmann, M., Hohnholt, M. C., & Blumrich, E. (2014). Glutathione-Dependent detoxification processes in astrocytes. *Neurochemical Research*, 40(12), 2570-2582. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1481-1>
36. Dringen, R., & Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biological Chemistry*, 384(4). <https://doi.org/10.1515/bc.2003.059>
37. Hirrlinger, J., & Dringen, R. (2005). Multidrug resistance protein 1-Mediated export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *En Methods in Enzymology* (pp. 395-409). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(05\)00023-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(05)00023-6)
38. Aswendt, M., Wilhelmsson, U., Wieters, F., Stokowska, A., Schmitt, F. J., Pallast, N., De Pablo, Y., L. M., Hoehn, M., Pekna, M., & Pekny, M. (2022). Reactive astrocytes prevent maladaptive plasticity after ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 209, 102199. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102199>
39. Erickson, E. K., Grantham, E. K., Warden, A. S., & Harris, R. A. (2019). Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 177, 34-60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.12.007>
40. Guerin, S., Melbourne, J. K., Dang, H., Shaji, C. A., & Nixon, K. (2023b). Astrocyte reactivity and neurodegeneration in the female rat brain following alcohol dependence. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.08.016>
41. Miguel-Hidalgo, J. J., & Rajkowska, G. (2003). Comparison of prefrontal cell pathology between depression and alcohol dependence. *Journal of Psychiatric Research*, 37(5), 411-420. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(03\)00049-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(03)00049-9)
42. Miguel-Hidalgo, J. J. (2009). The role of glial cells in drug abuse. *Current Drug Abuse Reviews*, 2(1), 76-82. <https://doi.org/10.2174/1874473710902010076>
43. Zahr, N. M., & Pfefferbaum, A. (2017). Alcohol's effects on the brain: neuroimaging results in humans and animal models. *PubMed*, 38(2), 183-206. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28988573>
44. Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Rosenbloom, M. J., Shear, P. K., Mathalon, D. H., & Lim, K. O. (1993). Increase in brain cerebrospinal fluid volume is greater in older than in younger alcoholic patients: a replication study and CT/MRI comparison. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 50(4), 257-274. [https://doi.org/10.1016/0925-4927\(93\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0925-4927(93)90004-2)
45. Pitel, A., Zahr, N. M., Jackson, K. V., Sassoon, S. A., Rosenbloom, M. J., Pfefferbaum, A., & Sullivan, E. V. (2010). Signs of preclinical Wernicke's encephalopathy and thiamine levels as predictors of neuropsychological deficits in alcoholism without Korsakoff's syndrome. *Neuropsychopharmacology*, 36(3), 580-588. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.189>
46. Volkow, N. D., Koob, G., & Baler, R. (2015). Biomarkers in Substance Use Disorders. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(4), 522–525. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00067>
47. Rosenbloom, M. J., & E.T.A.L. (1995). Structural Brain Alterations Associated With Alcoholism. *ALCOHOL HEALTH & RESEARCH WORLD*, 19(4), 266–272. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31798032/>
48. HARPER, C. G., & KRIL, J. J. (1990). NEUROPATHOLOGY OF ALCOHOLISM. *Alcohol and Alcoholism*, 25(2–3), 207–216. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a044994>
49. BREWER, C., & PERRETT, L. (1971). Brain Damage due to Alcohol Consumption: An Air-encephalographic, Psychometric and Electroencephalographic Study. *Addiction*, 66(3), 170–182. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1971.tb02382.x>
50. Rivera-Rivera, L., Natera, G., Séris-Martínez, M., Leyva-López, A., Zavala-Arciniega, L., Ortega-Ceballos, P. A., & Reynales-Shigematsu, L. M. (2021). ENCODAT 2016: Violencia de pareja y uso de tabaco, alcohol y drogas. Nuevos retos para la salud mental. *Salud Publica De Mexico*, 63(5), 630-640. <https://doi.org/10.21149/12288>
51. ENCODAT. (2017). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (2016)*. Recuperado 30 de agosto de 2023,

- https://encuestas.insp.mx/repositorio/encuestas/ENCODAT2016/doctos/informes/reporte_encodat_alcohol_2016_2017.pdf
52. *Abuso de sustancias*. (s. f.). OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/abuso-sustancias>
 53. World Health Organization: WHO. (2018). Harmful use of alcohol. *www.who.int*. https://www.who.int/health-topics/alcohol#tab=tab_1
 54. Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long-Evans and Wistar Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816-1823. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>
 55. Cicero, T. J. (1979). A critique of animal analogues of alcoholism. En *Springer eBooks* (pp. 533-560). https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3450-7_27
 56. Kuhn, B. N., Kalivas, P. W., & Bobadilla, A. (2019). Understanding addiction using animal models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00262>
 57. Ji, D., Gilpin, N. W., Richardson, H. G., Rivier, C., & Koob, G. F. (2008). Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on binge-like alcohol drinking in rats. *Behavioural Pharmacology*, 19(1), 1-12. <https://doi.org/10.1097/fbp.0b013e3282f3cf70>
 58. Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K., Chandler, L. J., Wise, R. A., & Bartlett, S. E. (2008a). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816-1823. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>
 59. Cippitelli, A., Damadzic, R., Singley, E., Thorsell, A., Ciccocioppo, R., Eskay, R. L., & Heilig, M. (2012). Pharmacological blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH1R) reduces voluntary consumption of high alcohol concentrations in non-dependent Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100(3), 522-529. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.10.016>
 60. Sabino, V., Kwak, J., Rice, K. C., & Cottone, P. (2012). Pharmacological characterization of the 20% alcohol intermittent Access model in Sardinian Alcohol-Preferring rats: A model of Binge-Like Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(4), 635-643. <https://doi.org/10.1111/acer.12008>
 61. Wise, R. A. (2009). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.004>
 62. Nalberczak-Skóra, M., Pattij, T., Beroun, A., Kogias, G., Mielenz, D., De Vries, T. J., Radwanska, K., & Müller, C. P. (2020). Personality driven alcohol and drug abuse: new mechanisms revealed. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 116, 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.023>
 63. Giuliano, C., Peña-Oliver, Y., Goodlett, C. R., Cardinal, R. N., Robbins, T. W., Bullmore, E. T., Belin, D., & Everitt, B. J. (2017). Evidence for a Long-Lasting Compulsive Alcohol seeking phenotype in rats. *Neuropsychopharmacology*, 43(4), 728-738. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.105>
 64. Radke, A. K., Jury, N. J., Kocharian, A., Marcinkiewicz, C. A., Lowery-Gionta, E. G., Pleil, K. E., McElligott, Z. A., McKlveen, J. M., Kash, T. L., & Holmes, A. (2015). Chronic ETOH effects on putative measures of compulsive behavior in mice. *Addiction Biology*, 22(2), 423-434. <https://doi.org/10.1111/adb.12342>
 65. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2004). NIAAA Council Approves Definition of Atracón Drinking. *NIAAA Newsletter*.
 66. Foltz, W. D., & Jaffray, D. A. (2012b). Principles of magnetic resonance imaging. *Radiation Research*, 177(4), 331-348. <https://doi.org/10.1667/rr2620.1>
 67. Huettel, S., Song, A., & McCarthy, G. (2004). Functional magnetic resonance imaging. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 86, Issue 2, pp. 316–317). <https://doi.org/978-0-87893-286-3>
 68. Liu, S., Cai, W., Zhang, F., Fulham, M., Feng, D., Pujol, S., & Kikinis, R. (2015). Multimodal Neuroimaging Computing: A review of the applications in neuropsychiatric disorders. *Brain Informatics*, 2(3), 167-180. <https://doi.org/10.1007/s40708-015-0019-x>
 69. Lerch, J. P., Sled, J. G., & Henkelman, R. M. (2010b). MRI phenotyping of genetically altered mice. En *Humana Press eBooks* (pp. 349-361). https://doi.org/10.1007/978-1-61737-992-5_17
 70. Ashburner, J., & Friston, K. (s. f.). *Morphometry*. Chapter 6 “Morphometry”
 71. Schreoder, L., & Faber, C. (2011). In vivo NMR imaging. En *Methods in molecular biology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-219-9>
 72. Zhao, Q., Fritz, M. E., Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Pohl, K. M., & Zahr, N. M. (2018). Jacobian maps reveal under-reported brain regions sensitive to extreme binge ethanol intoxication in the rat. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00108>
 73. Claus, E. D., Ewing, S. W. F., Filbey, F. M., Sabbineni, A., & Hutchison, K. E. (2011). Identifying neurobiological phenotypes associated with alcohol use disorder severity. *Neuropsychopharmacology*, 36(10), 2086-2096. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.99>
 74. Pando-Naude, V., Toxto, S., Fernandez-Lozano, S., Parsons, C. E., Alcauter, S., & Garza-Villarreal, E. A. (2021). Gray and White Matter Morphology in Substance Use Disorders: A Neuroimaging Systematic Review and Meta-analysis. *Translational Psychiatry*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01128-2>
 75. Carnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, 48(3), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>

76. Vetreno, R. P., Yaxley, R. H., Paniagua, B., & Crews, F. T. (2015). Diffusion tensor imaging reveals adolescent binge ethanol-induced brain structural integrity alterations in adult rats that correlate with behavioral dysfunction. *Addiction Biology*, 21(4), 939-953. <https://doi.org/10.1111/adb.12232>
77. West, R., Maynard, M. E., & Leasure, J. L. (2018). Binge ethanol effects on prefrontal cortex neurons, spatial working memory and task-induced neuronal activation in male and female rats. *Physiology & Behavior*, 188, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.01.027>
78. Chen, X., Zeng, J., Shen, Z., Kong, L., & Zheng, W. (2017). Diffusion Kurtosis imaging detects microstructural changes in the brain after acute alcohol intoxication in rats. *BioMed Research International*, 2017, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/4757025>
79. Zahr, N. M., Lenart, A. M., Karpf, J., Casey, K. M., Pohl, K. M., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2020). Multi-modal imaging reveals differential brain volumetric, biochemical, and white matter fiber responsivity to repeated intermittent ethanol vapor exposure in male and female rats. *Neuropharmacology*, 170, 108066. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108066>
80. Wise, R. A. (2009b). Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.004>
81. Mietchen, D., & Gaser, C. (2009). Computational morphometry for detecting changes in brain structure due to development, aging, learning, disease and evolution. *Frontiers in Neuroinformatics*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.11.025.2009>
82. Zahr, N. M., Mayer, D., Rohlfing, T., Orduna, J., Luong, R., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2013). A mechanism of rapidly reversible cerebral ventricular enlargement independent of tissue atrophy. *Neuropsychopharmacology*, 38(6), 1121-1129. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.11>
83. Renteria, R., Baltz, E. T., & Gremel, C. M. (2018). Chronic alcohol exposure disrupts top-down control over basal ganglia action selection to produce habits. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02615-9>
84. Pfefferbaum, A., Zahr, N. M., Mayer, D., Rohlfing, T., & Sullivan, E. V. (2015). Dynamic responses of selective brain white matter fiber tracts to binge alcohol and recovery in the rat. *PLOS ONE*, 10(4), e0124885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124885>
85. Robinson, N. B., Krieger, K., Khan, F., Huffman, W. A., Chang, M. M., Naik, A., Ruan, Y., Hameed, I., Krieger, K. H., Girardi, L. N., & Gaudino, M. (2019). The Current State of Animal Models in Research: A review. *International Journal of Surgery*, 72, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2019.10.015>
86. Goltseker, K., Hopf, F. W., & Barak, S. (2019). Advances in behavioral animal models of alcohol use disorder. *Alcohol*, 74, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.05.014>
87. Goerzen, D., Fowler, C., Devenyi, G. A., Germann, J., Madularu, D., Chakravarty, M. M., & Near, J. (2020). An MRI-Derived Neuroanatomical Atlas of the Fischer 344 rat brain. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63965-x>
88. Abdulateef, S. K., & Salman, M. D. (2021). A comprehensive review of image segmentation techniques. *Al-mağallā' al-'irāqīyyā' al-handasā' al-kahrabā'īyyā' wa-al-iliktrūniyyā'*, 17(2), 166-175. <https://doi.org/10.37917/ijeee.17.2.18>
89. Demirakca, T., Ende, G., Kämmerer, N., Welzel-Marquez, H., Hermann, D., Heinz, A., & Mann, K. (2011). Effects of alcoholism and continued abstinence on brain volumes in both genders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, no. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01514.x>
90. Bourbon-Teles, J., Bentley, P., Koshino, S., Shah, K., Dutta, A., Malhotra, P., Egner, T., Husain, M., & Soto, D. (2014). Thalamic control of human attention driven by memory and learning. *Current Biology*, 24(9), 993-999. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.024>
91. *Watershed separation*. (s. f.). ImageJ Wiki. <https://imagej.net/imaging/watershed>
92. *ImageJ: Thresholding — Introduction to Bioimage analysis*. (s. f.). <https://bioimagebook.github.io/chapters/2-processing/3-thresholding/imagej.html>
93. Johnson, P. (s. f.). *An introduction to image analysis using ImageJ*. Mark Willett, Imaging and Microscopy Centre, Biological Sciences, University of Southampton.
94. *Classic Watershed*. (s. f.). ImageJ Wiki. <https://imagej.net/plugins/classic-watershed>
95. Matejuk, A., & Ransohoff, R. M. (2020). Crosstalk between Astrocytes and microglia: An Overview. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>
96. Zhang CJ, Jiang M, Zhou H, Liu W, Wang C, Kang Z, et al. TLR-stimulated IRAKM activates caspase-8 inflammasome in microglia and promotes neuroinflammation. *J Clin Invest*. (2018) 128:5399–412. doi: 10.1172/JCI121901
97. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. (2018) 18:225–42. doi: 10.1038/nri.2017.125
98. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. (2018) 362:181–5. doi: 10.1126/science.aat0473
99. Garland, E. F., Hartnell, I. J., & Boche, D. (2022). Microglia and astrocyte Function and communication: What do we know in humans? *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.824888>
100. Singhal, G., & Baune, B. T. (2017). Microglia: an interface between the loss of neuroplasticity and depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00270>

101. Andoh, M., & Koyama, R. (2021). Microglia regulate synaptic development and plasticity. *Developmental Neurobiology*, *81*(5), 568-590. <https://doi.org/10.1002/dneu.22814>
102. Perez-Catalan, N. A., Doe, C. Q., & Ackerman, S. D. (2021). The role of astrocyte-mediated plasticity in neural circuit development and function. *Neural Development*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s13064-020-00151-9>
103. Portis, S. M., & Haass-Koffler, C. L. (2020). New microglial mechanisms revealed in alcohol use Disorder: How does that translate? *Biological Psychiatry*, *88*(12), 893-895. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.08.025>
104. Henriques, J., Portugal, C. C., Canedo, T., Relvas, J. B., Summavielle, T., & Socodato, R. (2018). Microglia and alcohol meet at the crossroads: microglia as critical modulators of alcohol neurotoxicity. *Toxicology Letters*, *283*, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.002>
105. Warden, A. S., Wolfe, S. A., Khom, S., Varodayan, F. P., Patel, R. R., Steinman, M. Q., Bajo, M., Montgomery, S., Vlkolinsky, R., Nadav, T., Polis, I., Roberts, A. J., & Mayfield, R. D. (2020). Microglia Control Escalation of drinking in Alcohol-Dependent mice: Genomic and synaptic drivers. *Biological Psychiatry*, *88*(12), 910-921. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.05.011>
106. Ashburner, J., & Friston, K. J. (2009). Voxel based morphometry. En *Elsevier eBooks* (pp. 471-477). <https://doi.org/10.1016/b978-008045046-9.00306-5>
107. Pfefferbaum, A., Zahr, N. M., Mayer, D., Rohlfing, T., & Sullivan, E. V. (2015b). Dynamic responses of selective brain white matter fiber tracts to binge alcohol and recovery in the rat. *PLOS ONE*, *10*(4), e0124885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124885>
108. Vengeliene, V., Bilbao, A., & Spanagel, R. (2014). The Alcohol Deprivation Effect Model for Studying relapse Behavior: A comparison between rats and mice. *Alcohol*, *48*(3), 313-320. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.002>
109. Gazdzinski, S., Durazzo, T. C., Mon, A., Yeh, P., & Meyerhoff, D. J. (2010). Cerebral white matter recovery in abstinent alcoholics—A multimodality magnetic resonance study. *Brain*, *133*(4), 1043-1053. <https://doi.org/10.1093/brain/awp343>
110. Daviet, R., Aydogan, G., Jagannathan, K., Spilka, N., Koellinger, P., Kranzler, H. R., Nave, G., & Wetherill, R. R. (2022). Associations between alcohol consumption and gray and white matter volumes in the UK Biobank. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28735-5>
111. Sullivan, E. V., Zahr, N. M., Sassoon, S. A., Thompson, W. K., Kwon, D., Pohl, K. M., & Pfefferbaum, A. (2018). The role of aging, drug dependence, and hepatitis C comorbidity in alcoholism cortical compromise. *JAMA Psychiatry*, *75*(5), 474. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.0021>
112. Montgomery, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. (2007). Introduction to Linear Regression Analysis, Solutions Manual (Wiley Series in Probability and Statistics). En *Wiley-Interscience eBooks*. <https://dl.acm.org/citation.cfm?id=1196925>
113. Angeles, D. (2022). *FENOTIPO MORFOLÓGICO CEREBRAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE UN MODELO DE ALCOHOLISMO EN RATAS* [Tesis de Maestría]. UNAM.
114. Lopez-Castro, A. (2022). *Estimulación eléctrica focal repetitiva como intervención en un modelo de consumo de alcohol en ratas* [Tesis de Maestría]. UNAM.
115. De Santis, S., Sommer, W., & Canals, S. (2019). Detecting Alcohol-Induced brain damage noninvasively using diffusion tensor imaging. *ACS Chemical Neuroscience*, *10*(10), 4187-4189. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00481>
116. Chen, X., Zeng, J., Shen, Z., Kong, L., & Zheng, W. (2017b). Diffusion Kurtosis imaging detects microstructural changes in the brain after acute alcohol intoxication in rats. *BioMed Research International*, *2017*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/4757025>
117. Lowe, P., Morel, C., Ambade, A., Iracheta-Vellve, A., Kwiatkowski, E., Satishchandran, A., Furi, I., Cho, Y., Gyongyosi, B., Catalano, D., Lefebvre, E., Fischer, L., Seyedkazemi, S., Schafer, D. P., & Szabo, G. (2020). Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01972-5>
118. Dubois, J., Field, R. M., Jawhar, S., Jewison, A., Koch, E., Aghajan, Z. M., Miller, N., Perdue, K. L., & Taylor, M. (2023). Change in brain asymmetry reflects level of acute alcohol intoxication and impacts on inhibitory control. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37305-8>
119. Cuadros, M. A., Sepúlveda, M. R., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J. L., & Neubrand, V. E. (2022). Microglia and Microglia-Like cells: Similar but different. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.816439>
120. Xu, Y., Chen, X., Gao, Q., & Zheng, W. (2018). Microstructural Changes in the Brain after Acute Alcohol Intoxication Accompanied by Diffuse Axonal Injury in Rats: Assessed In Vivo Using Diffusion Kurtosis Imaging. *Sf*, *8*(6), 1853-1860. <https://doi.org/10.4172/neuropsychiatry.1000528>
121. Mori, S., & Barker, P. B. (1999). Diffusion magnetic resonance imaging: Its principle and applications. *The anatomical record*, *257*(3), 102-109. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(19990615\)257:3](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(19990615)257:3)
122. Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, *34*(5), 455-465. <https://doi.org/10.1080/01926230600867743>
123. Corazza, G. R., Addolorato, G., Biagi, F., Caputo, F., Castelli, E., Stefanini, G. F., & Gasbarrini, G. (1997). Splenic Function and Alcohol Addiction. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *21*(2), 197-200. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03749.x>

124. Kashani, A., Salehi, B., Anghesom, D., Kawayeh, A. M., Rouse, G. A., & Runyon, B. A. (2015). Spleen Size in Cirrhosis of Different Etiologies. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 34(2), 233–238. <https://doi.org/10.7863/ultra.34.2.233>
125. Mirela Budeč, Zivana Milicevic, & Vesna Koko. (2000). Stereological study of rat spleen following acute ethanol treatment. *Indian Journal of Experimental Biology*, 38(5), 462–466.
126. Romulo Celli & Xuchen Zhang. (2014). Pathology of Alcoholic Liver Disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2(2). <https://doi.org/10.14218/jcth.2014.00010>
127. Rorat, M., Haloń, A., & Jurek, T. (2020). Histology of Liver of the Deceased Due to Harmful Use of Alcohol. *Alcohol and Alcoholism*, 55(5), 518–523. <https://doi.org/10.1093/alcalc/aa0059>
128. Sakhuja, P. (2014). Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16474. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16474>
129. Theise, N. D. (2013). Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease*, 2(2), 64–67. <https://doi.org/10.1002/cld.172>
130. Walia, A. S., Pruitt, K. M., Rodgers, J. D., & Lamon, E. W. (1987). In vitro effect of ethanol on cell-mediated cytotoxicity by murine spleen cells. *Immunopharmacology*, 13(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/0162-3109\(87\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0162-3109(87)90023-3)
131. Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M. L., Bennett, F. C., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S. D., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., . . . Wyss-Coray, T. (2022). Microglia States and Nomenclature: a field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
132. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O’Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W., Cohen-Salmon, M., . . . Verkhratsky, A. (2021). Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and future Directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
133. Erickson, E. K., DaCosta, A., Mason, S., Blednov, Y. A., Mayfield, R. D., & Harris, R. A. (2020). Cortical astrocytes regulate ethanol consumption and intoxication in mice. *Neuropsychopharmacology*, 46(3), 500–508. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0721-0>
134. Reyes-Haro, D., López-Juárez, A., & Rodríguez-Contreras, A. (2023). Editorial: Physiology and Pathology of Neuroglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1246885>
135. Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., & Tremblay, M. (2016). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *The Journal of Physiology*, 595(6), 1929–1945. <https://doi.org/10.1113/jp272134>
136. Han, R. T., Kim, R. D., Molofsky, A. V., & Liddelow, S. A. (2021). Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity*, 54(2), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.01.013>
137. Chen, J., Ma, X., Zhao, H., Wang, X. Y., Xu, M., Wang, H., Yang, T., Cheng, P., Liu, S., Huang, M., Zhou, Y., & Shen, Y. (2021). Increasing astrogenesis in the developing hippocampus induces autistic-like behavior in mice via enhancing inhibitory synaptic transmission. *GLIA*, 70(1), 106–122. <https://doi.org/10.1002/glia.24091>
138. Hasel, P., Rose, I. V., Sadick, J. S., Kim, R. D., & Liddelow, S. A. (2021). Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain. *Nature Neuroscience*, 24(10), 1475–1487. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00905-6>
139. Carnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*, 48(3), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>
140. Colombo, G., Cubero, R. J., Kanari, L., Venturino, A., Schulz, R., Scolamiero, M., Agerberg, J., Mathys, H., Tsai, L., Chachólski, W., Hess, K., & Siegert, S. (2022). A tool for mapping microglial morphology, MorphOMICS, reveals brain-region and sex-dependent phenotypes. *Nature Neuroscience*, 25(10), 1379–1393. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01167-6>