



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación histológica de los efectos
neurodegenerativos del etanol en el sistema
nervioso central de la rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAULA MARTINELL GARCÍA

DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	Martinell García Paula 21563224 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 304501649
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno	Dra. Milagros Méndez Ubach
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno	Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido Paterno Apellido Materno	Dra. Edith Araceli Cabrera Muñoz
7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año	Evaluación histológica de los efectos neurodegenerativos del etanol en el sistema nervioso central de la rata. 73 p. 2013

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de un financiamiento otorgado por el programa “Convocatoria 2008 de apoyo para investigadores nacionales para el fortalecimiento de actividades de tutoría y asesoría de estudiantes de nivel licenciatura”, con número de referencia 102317, y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), mediante un financiamiento y la asignación de un beca para estudiantes de licenciatura correspondiente al período agosto 2008-agosto 2009, con referencia PICDS08-3.

Agradezco por su apoyo con consejos sobre las técnicas histológicas utilizadas en el presente trabajo al equipo de la Dra. Lourdes Massieu Trigo (en especial a Teresa Montiel Montes) del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), al equipo del Dr. Julio Morán Andrade, del mismo instituto, por su consejos en lo que refiere a los procesos de muerte neuronal. Por su apoyo con equipo de laboratorio, agradezco al grupo del Dr. Ignacio Camacho de la Facultad de Química (UNAM) y al grupo de la Dra. Martha León del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

Por su apoyo en la realización de los experimentos reportados en este trabajo, agradezco al personal y estudiantes del Departamento de Neuroquímica del INPRF, Cosette Reyes Guzmán, Sara Herrera Ordóñez, Marcelo Bustillos Boutier, Edith Cabrera Muñoz y Karla Hernández Fonseca.

Por último agradezco a todas las personas que estuvieron a mi lado durante el largo proceso de la carrera y de la elaboración de tesis, quienes me apoyaron en todo momento; mis padres Julio y Mercedes; mi hermano Victor; mi prima Marena; mis mejores amigos de la carrera Karen, Lalo, Chuy, Angel, Roxana y, en su momento, Toño y Andrea; y, finalmente, a Mauricio.

Lista de abreviaturas

5-HT	Serotonina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ATV	Área tegmental ventral
CAS	Concentración de alcohol en sangre
CREB	Elemento de respuesta al cAMP
CYP2E1	Isozima 2E1 del citocromo p450
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EtOH	Etanol
GABA	Ácido gamma aminobutírico
MRI	Imágenes de resonancia magnética
Nacc	Núcleo Accumbens
NFκB	Factor nuclear κ-B
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
NOX	NADPH oxidasa
PBS	Sal amortiguadora de fosfatos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SN	Substantia nigra
SNC	Sistema nervioso central
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
XOX	Xantina oxidasa

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	7
3. Antecedentes	9
3.1. El alcohol como droga de abuso	9
3.1.1. Ciclo adictivo y reforzamiento del etanol	9
3.1.2. Sistemas de neurotransmisores involucrados en las acciones del alcohol	12
3.2 Metabolismo del alcohol	15
3.3 Neurodegeneración asociada al alcohol	19
3.3.1 Regiones cerebrales afectadas y neuropatologías asociadas	19
3.3.2 Mecanismos de daño neuronal inducidos por el alcohol	24
3.3.3 Factores implicados en los efectos neurodegenerativos del alcohol en modelos animales	29
4. Justificación	30
5. Hipótesis	31
6. Objetivos	31
6.1. Objetivos específicos	31
7. Métodos	32
7.1. Tratamiento de los animales	32
7.2. Tratamiento del tejido	33
7.3. Procedimientos de tinción	33
7.3.1. Tinción con violeta de cresilo	33
7.3.2. Tinción de Fluoro-Jade B / DAPI	34
7.4 Determinación de alcohol en sangre	35
7.4.1 Obtención del plasma sanguíneo	35
7.4.2 Desproteínización de las muestras	35
7.4.3 Principio para la determinación de la concentración de alcohol en sangre	35
7.4.4 Preparación de la curva estándar de alcohol	35
7.4.5 Cuantificación de la concentración de alcohol en plasma	36
7.5 Cuantificación de células en degeneración	37
7.6 Análisis estadístico	37
8. Resultados	38
8.1. Integridad del tejido nervioso	38
8.2. Evaluación del daño inducido por la exposición crónica de alcohol en el cerebro de la rata	39
8.3. Niveles plasmáticos de alcohol en ratas expuestas crónicamente a etanol por 30 días	44
8.4. Evaluación del daño inducido por la exposición subcrónica “binge” de alcohol en el cerebro de la rata	44

8.5. Niveles plasmáticos de alcohol en ratas tratadas subcrónicamente con etanol por 4 días	52
9. Discusión	55
10. Conclusiones y Perspectivas	59
11. Referencias	60
12. Anexo	72
12.1. Soluciones Generales	72
12.2. Soluciones para la tinción con violeta de cresilo	72
12.3. Soluciones para la tinción Fluoro-Jade B / DAPI	72
12.4. Soluciones para la determinación de alcohol en sangre	73

1. Resumen

La exposición crónica a etanol está asociada con procesos neurotóxicos y neurodegenerativos en regiones específicas del cerebro, cuyo daño se asocia con un amplio rango de disfunciones cognitivas y de memoria. El tipo y la magnitud del daño dependen de los patrones y periodos de exposición a la droga, así como de la dosis de alcohol administrada. Las regiones reportadas con mayor daño en pacientes alcohólicos y en modelos animales de alcoholismo comprenden la corteza prefrontal, el tálamo e hipotálamo, las estructuras del lóbulo temporal medial (el hipocampo, el giro dentado, el complejo subicular y las cortezas perirrinal, entorrinal y parahipocampal), el prosencéfalo basal y el cerebelo. Sin embargo, algunas regiones que conforman la vía mesocorticolímbica, responsable de los mecanismos de reforzamiento y recompensa del etanol y otras drogas de abuso, no se han explorado detenidamente en busca de daño. El presente proyecto se enfocó en examinar las regiones del sistema mesocorticolímbico del cerebro de ratas tratadas crónicamente con alcohol, sin dejar de explorar el resto de las áreas cerebrales, e identificar las zonas que pudieran presentar daño. Se expusieron ratas macho Wistar a etanol, siguiendo dos tratamientos distintos. El primero consistió en 30 días de consumo voluntario de etanol al 10%, sacrificando a las ratas 0, 24 o 48 h después del día 30. El grupo control se mantuvo los 30 días bajo condiciones *ad libitum* de agua y comida. En el segundo tratamiento, las ratas recibieron una dosis de 3g/kg (i.p.) de etanol cada 8 h durante 4 días y se sacrificaron 1, 4, 8 y 24 h después de la última dosis. Los animales control recibieron un volumen equivalente de solución salina. Los cerebros de los animales se congelaron y cortaron en un criostato, se tiñeron con Fluoro-Jade B y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia. La sangre troncal de los animales se colectó para medir los niveles de alcohol en sangre. Se encontraron células positivas a Fluoro-Jade en diferentes regiones (corteza piriforme, corteza frontal de asociación, estriado y tálamo dorsal), pero en ningún caso la cantidad de células fue significativa para determinar daño. No hubo diferencias entre el tipo de tratamiento usado o el momento de sacrificio con respecto a la cantidad de células marcadas con Fluoro-Jade que se encontró en cada caso. Dado que el número de células dañadas por alcohol fue bajo en los dos protocolos de tratamiento empleados, y ya que el Fluoro-Jade solo marca células en proceso de degeneración, existe la posibilidad de que las células afectadas por etanol pudieran haber sufrido una degeneración previa al sacrificio de los animales. Alternativamente, las concentraciones de etanol que se alcanzaron con los protocolos empleados y el tiempo que éstas se mantuvieron elevadas en el organismo no fueron suficientes para provocar muerte celular.

2. Introducción

El uso y abuso del alcohol es un factor de riesgo para la salud, que ocupa el tercer lugar a nivel mundial (OMS, 2011). Se ha estimado que contribuye en un 4% al riesgo global de muerte en el mundo, encontrándose apenas por debajo del tabaquismo, que contribuye en un 4.1%. Los países en donde el consumo de alcohol tiene un peso relativamente bajo son los países musulmanes y africanos; otros un poco por arriba del promedio son países como China, Japón y Australia. Estados Unidos, Canadá y Europa occidental tienen un riesgo considerablemente mayor, mientras que los países con un riesgo de más del doble que el promedio global son México, la mayoría de los países latinoamericanos y los países pertenecientes a la ex-Unión Soviética (González y Alcalá, 2005). Las variaciones en la proporción de muertes atribuibles al consumo del

alcohol se deben en parte a la cantidad absoluta de alcohol que ingieren las poblaciones y también a los patrones de consumo.

México no tiene un consumo de alcohol *per capita* muy alto comparado con el de otros países. Sin embargo, la gravedad de sus consecuencias en la salud es similar o mayor. Las diferencias del peso relativo del consumo de alcohol en la mortalidad en una población no corresponden de manera lineal con la cantidad de alcohol que se consume en cada país. El dividir la cantidad total de alcohol consumida en un país entre el número de habitantes no es una cifra que refleje realmente el consumo *per capita*. Para conocer la magnitud real del alcohol consumido y del impacto social y en la salud que esto tiene es necesario conocer la cantidad real de personas que consumen bebidas alcohólicas, bajo qué patrones lo hacen (episodios cortos con grandes cantidades, pocas copas diariamente, etc) y los grados de dependencia a la droga que presentan (CISMAD, 1997).

En México, alrededor del 46.3% de la población entre 12 y 65 años ingiere bebidas alcohólicas; este porcentaje corresponde a una cantidad aproximada de 34 millones de mexicanos. De este total, alrededor de 4 millones presentan patrones de abuso o dependencia al alcohol, alrededor de un millón y medio requiere tratamiento residencial (internamiento en clínicas para desintoxicación y rehabilitación), y sólo tres de cada diez personas reciben algún tipo de tratamiento; atenderlos a todos representaría un costo de mil 200 millones de pesos anuales para el estado mexicano (ENA, 2008). Existe una proporción importante de la población que es abstemia, y corresponde en su mayoría a la población femenina. La cantidad de alcohol consumida en el país es bebida básicamente por hombres de edad media y el 78% de esta cantidad se consume por el 25% de los bebedores (bebedores más fuertes). El patrón más frecuente de consumo corresponde a cantidades muy elevadas en periodos de pocos días (consumo alto por ocasión). Estos son factores importantes que posicionan a México entre los países con mayor incidencia de padecimientos y trastornos asociados a la ingesta de alcohol (Tabla1). Se ha estimado que el abuso de alcohol por sí solo representa el 9% del peso total de las enfermedades en nuestro país (Medina *et al.*, 2002).

Tabla1. Causas de muerte y desórdenes asociados al consumo crónico de alcohol en México.

Causas de mortalidad	Desórdenes
Enfermedad isquémica del corazón 13.3%	Depresión unipolar 6.4%
Diabetes mellitus 9.9%	Asfixia y trauma de nacimiento 4.2%
Enfermedad cerebrovascular 6.1%	Diabetes mellitus 3.6%
Cirrosis del hígado 5.6%	Enfermedad isquémica del corazón 3.2%
Accidentes de tráfico 4.4%	Cirrosis del hígado 3.1%
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica 4.0%	Asma 2.5%
Infecciones respiratorias 3.6%	Otros trastornos por uso de alcohol 2.5%
Hipertensión 3.3%	Esquizofrenia 2.1%
Asfixia y trauma al nacimiento 2.9%	Enfermedad cerebrovascular 2.1%
Nefritis y nefrosis 2.7%	
Violencia 2.2%	

Adaptado de González-Pier *et al.* (2006).

Los estudios epidemiológicos establecen que aproximadamente el 32% de las muertes por cirrosis se deben al consumo de alcohol (otro porcentaje con gran peso se debe a la hepatitis C). Sin embargo, la cirrosis no es la única lesión grave que ocasiona el alcohol. El consumo de alcohol se ha asociado como riesgo de al menos 60 trastornos o complicaciones médicas, como son, algunos desórdenes psiquiátricos, neoplasias de boca, esófago e hígado, problemas cardiovasculares y renales, diabetes y homicidios o muertes por accidentes (González y Alcalá, 2005).

En la ciudad de México, al menos 700 mil menores de edad tienen problemas por consumo excesivo de alcohol y esta enfermedad se localiza en el cuarto lugar de las diez principales causas generadoras de discapacidad. En jóvenes de entre 15 y 19 años de edad, la primera causa de defunción es por accidentes automovilísticos relacionados con el consumo de alcohol, que constituyen el 15% de las muertes; en segundo lugar se encuentran los homicidios con un 14.6% y los suicidios con un 6% de los fallecimientos (Berruecos Villalobos, 2005). Muchas enfermedades o discapacidades provocadas por el consumo excesivo de alcohol son el reflejo del daño en el Sistema Nervioso Central (SNC). Conocer los mecanismos mediante los cuales esta sustancia perjudica a las estructuras cerebrales es crucial para desarrollar estrategias que puedan disminuir o evitar este tipo de daño. La rata es un animal que presenta una organización del SNC muy parecida a la del humano, por lo que resulta muy útil para estudios en este ámbito.

3. Antecedentes

3.1. El alcohol como droga de abuso

3.1.1 Ciclo adictivo y reforzamiento del etanol

El consumo de drogas de abuso, entre ellas el alcohol, puede ser ocasional o limitado, y en este caso no genera patologías o complicaciones médicas, pero cuando ocurre una transición al uso descontrolado de la sustancia, se genera una serie de problemas clínicos de diversa índole y gravedad. Una característica fundamental en las definiciones de dependencia y adicción a una droga es el consumo compulsivo de la droga sin una medida ni control en dicho acto (Koob y Volkow, 2009).

La adicción a una droga es un desorden crónico que se caracteriza por la búsqueda y el uso compulsivo de la sustancia, la pérdida de autocontrol en el consumo de la droga y el surgimiento de un estado emocional negativo cuando se impide el acceso a ésta (síndrome de abstinencia). Por lo tanto, se trata de un síndrome que puede ser descrito como un proceso cíclico de tres etapas: intoxicación (uso de dosis elevadas de la droga en periodos breves, “binge”), privación (estado afectivo negativo) y anticipación (antojo de la droga), que lleva nuevamente a la intoxicación. Las tres etapas interaccionan entre sí, se vuelven cada vez más intensas y finalmente conducen al estado patológico conocido como adicción (Koob y Volkow, 2009).

El reforzamiento es un concepto de especial relevancia en el tema de las adicciones y hace referencia a la relación de un comportamiento y sus consecuencias. Se define como el proceso mediante el cual ciertos estímulos incrementan la probabilidad de una respuesta. En el contexto de las adicciones, la probabilidad de que una droga sea autoadministrada puede ser incrementada directamente por reforzamiento positivo y/o negativo. El reforzamiento positivo es el proceso mediante el cual la presencia de un

estímulo incrementa la probabilidad del consumo (i.e., estado de euforia tras la administración de la droga), mientras que en el reforzamiento negativo se busca que el consumo de la droga termine con una sensación aversa (i.e., alivio de la ansiedad) y esto genera un incremento en la probabilidad del consumo de la sustancia (Koob, 1999).

El síndrome adictivo tiene aspectos de desórdenes conductuales impulsivos y compulsivos. Los desórdenes en las conductas impulsivas están asociados a los mecanismos de reforzamiento positivo, pues se caracterizan por un incremento en las sensaciones de tensión, agitación y expectación antes de consumir la droga y por las sensaciones de placer, gratificación y alivio o relajación después de cometer dicho acto. Por el contrario, los desórdenes de conductas compulsivas se caracterizan por las sensaciones de ansiedad y estrés antes de cometer el acto compulsivo y un alivio de estas sensaciones al llevarlo a cabo, por lo que se asocian a los mecanismos de reforzamiento negativo (Koob y Volkow, 2009). El colapso de varios ciclos impulsivos y compulsivos conduce a la formación del ciclo adictivo, compuesto por las tres etapas mencionadas anteriormente (intoxicación, privación y anticipación). Los comportamientos impulsivos dominan las primeras etapas del proceso y los comportamientos impulsivos combinados con los compulsivos dominan las etapas tardías (Koob y Volkow, 2009).

En el cerebro de los mamíferos existe un sistema neuronal que se encarga de reforzar los comportamientos que son necesarios para la supervivencia y reproducción del organismo, lo cual se logra mediante la sensación de placer que favorecerá el mantenimiento del acto y asegurará que sea repetido. La activación de este sistema se desencadena con acciones como la ingesta de comida propiciada por la sensación de hambre, el deseo sexual o el comportamiento maternal (Alcaro *et al.*, 2007; Roberts y Koob, 1997). Estos comportamientos motivados tienen la propiedad de causar una recompensa y un reforzamiento. Por ejemplo, si un organismo tiene la motivación de beber por medio de la sensación de sed, el consumo de agua se percibe como una experiencia positiva y afectiva (de recompensa) y este estado de recompensa ocasiona un incremento de los estímulos que lo generaron (estímulos reforzadores). Sin embargo, este circuito de recompensa, conocido como sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, también se activa en respuesta a otros estímulos que no son naturales y cuyo objetivo no está enfocado a la supervivencia de la especie. Las drogas de abuso forman parte de este tipo de estímulos; por lo tanto, su presencia en el SNC produce la sensación de placer (recompensa) y estimula la búsqueda y repetición del acto (Alcaro *et al.*, 2007; Koob, 1999; Roberts y Koob, 1997).

El sistema mesocorticolímbico está formado por los somas neuronales del área tegmental ventral (ATV), que corresponden al grupo celular dopaminérgico A10, y sus proyecciones, que los conectan con el núcleo accumbens (NAcc) y el prosencéfalo basal (que incluye el tubérculo olfatorio, la corteza frontal y la amígdala) (Figura 1). El neurotransmisor de mayor importancia en este sistema es la dopamina (DA), pero también están involucrados otros neurotransmisores y neuromoduladores con función reguladora, como la serotonina, los péptidos opioides, el glutamato y el ácido gamma aminobutírico (GABA) (Björklund y Dunnett, 2007; Roberts y Koob, 1997).

El sistema dopaminérgico (DAérgico) del cerebro no se limita a las interconexiones del sistema mesocorticolímbico; ya que también incluye a la vía nigroestriatal. Esta vía se origina en las neuronas DAérgicas del grupo A9 en la substantia nigra (SN) *pars*

compacta, que proyectan hacia los núcleos caudado y putamen, que juntos conforman el cuerpo estriado en algunos organismos (Björklund y Dunnett, 2007; Haber y Knutson, 2009) (Figura 1).

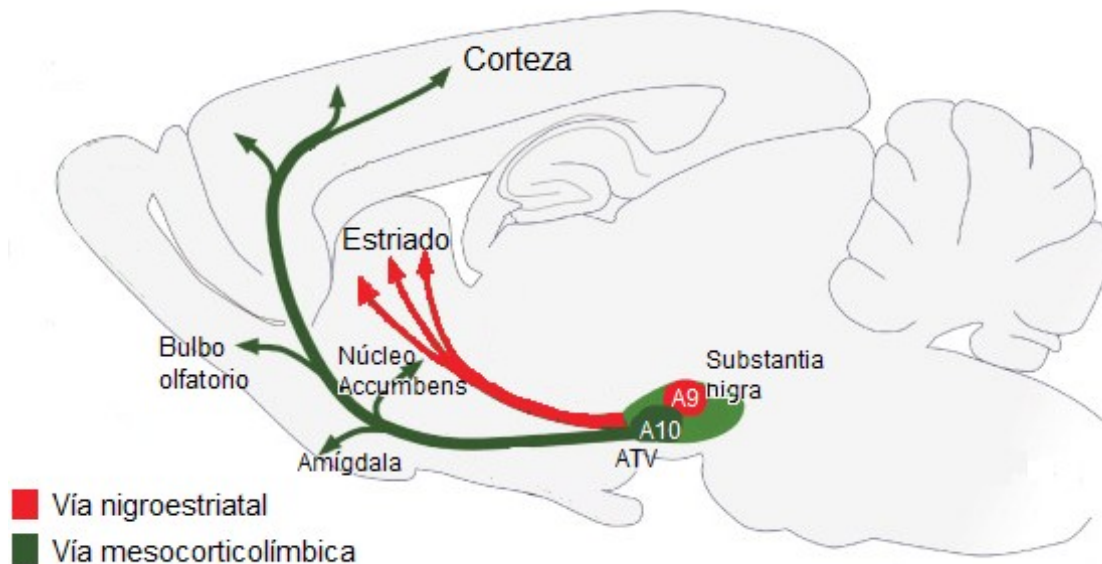


Figura 1. Vías dopaminérgicas mesocorticolímbica y nigroestriatal ilustradas en el cerebro de rata. Modificada de Björklund y Dunnett (2007).

La substantia nigra y el cuerpo estriado forman parte de un conjunto de núcleos de diverso origen situados en la base frontal del cerebro, conocido como los ganglios basales. El globo pálido o pallidum y los núcleos subtalámicos son los otros elementos que integran este conjunto. Anteriormente, los ganglios basales eran mejor conocidos por su relevancia en funciones motoras. Actualmente se sabe que los ganglios basales también juegan un papel importante en mediar los comportamientos dirigidos a una meta, incluyendo emociones, motivaciones y procesos cognitivos (Mogenson *et al.*, 1980; Nauta, 1986; Haber *et al.*, 2006).

Existe también un conjunto de estructuras cerebrales, conocido como la amígdala extendida, que tiene una influencia importante en el comportamiento emocional, social, sexual y en las respuestas de estrés. La amígdala extendida es una nomenclatura que se ha utilizado en los últimos años y comprende al núcleo central de la amígdala, al núcleo del lecho de la *stria terminalis* (“bed nucleus of the stria terminalis”), la corteza (“shell”) del NAcc y la substantia innominata sublenticular (McDonald, 2003; Nestler *et al.*, 2001) (Figura 2). Específicamente, el núcleo central de la amígdala se asocia con el comportamiento relacionado al miedo, las respuestas hormonales y la modulación de las reacciones afectivas al estrés, como las provocadas por el abuso de ciertas drogas (Petrasch-Parwez *et al.*, 2007).

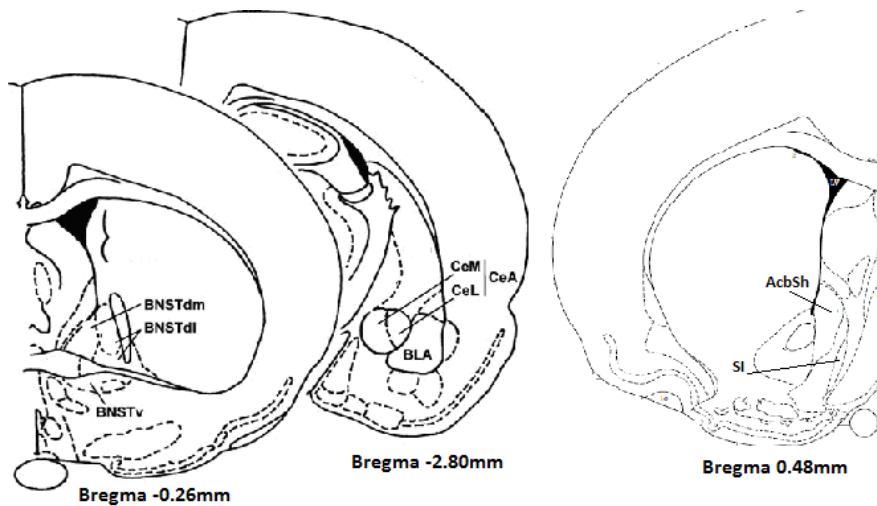


Figura 2. Estructuras de la amígdala extendida. BNSTdm= núcleo del lecho de la *stria terminalis*, dorsomedial. BNSTdl= núcleo del lecho de la *stria terminalis*, dorsolateral. BNSTv= núcleo del lecho de la *stria terminalis*, ventral. CeA= núcleo central de la amígdala. SI= substancia innominata. AcbSh= corteza (“shell”) del núcleo accumbens. Modificada de Paxinos y Watson (1998) y de Hammack *et al.* (2010).

Las relaciones entre las regiones involucradas en los circuitos de reforzamiento y su papel en la constitución de los comportamientos adictivos no se conocen detalladamente, pero la información con la que se cuenta hasta el momento indica la participación de elementos clave en las tres etapas del ciclo adictivo mencionadas anteriormente. Las zonas del ATV y el NAcc son cruciales en la etapa de “binge”-intoxicación. Las estructuras de la amígdala extendida son importantes en la fase de privación-afección, y en la etapa de preocupación-anticipación participa una amplia red que involucra a la corteza orbitofrontal, al estriado dorsal, la corteza prefrontal, la amígdala basolateral, el hipocampo y la insula. La transición a la adicción involucra la neuroplasticidad en todas estas estructuras, que comienza con cambios en el sistema DAérgico mesolímbico (Koob y Volkow, 2009).

3.1.2. Sistemas de neurotransmisores involucrados en las acciones del alcohol.

El etanol es una droga débil. Se requieren dosis altas de la sustancia (decenas de gramos) para producir un efecto farmacológico, a diferencia de la mayoría de las drogas que actúan en el organismo a dosis de miligramos o microgramos por kilogramo.

La molécula de etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, pertenece al grupo químico de compuestos denominado alcoholes por la presencia de un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) unido a un átomo de carbono. Esta molécula no posee ningún carbón asimétrico, por lo que su interacción con substratos biológicos, comparada con las interacciones receptor-ligando de la mayoría de las drogas, no es esterosselectiva; debido a esto no se ha descrito un receptor para etanol. Aún así, el etanol produce efectos de gran complejidad en los sistemas neuronales, lo que se debe a la simplicidad de su estructura química: el grupo hidroxilo la convierte en una molécula polar que favorece la formación de puentes de hidrógeno o la ruptura de los previamente existentes con los grupos de proteínas aceptores o donadores de electrones o con los grupos polares de los fosfolípidos de membrana; las interacciones con estos últimos producen un incremento en la permeabilidad de las membranas. El otro extremo de la molécula de etanol, la mitad alifática opuesta al grupo

hidroxilo, provee un grupo lipofílico que puede interactuar con dominios no polares de macromoléculas; sin embargo, el etanol es poco soluble en lípidos. La formación de puentes de hidrógeno permite que el etanol se solubilice en agua en cualquier proporción. El etanol también puede modificar la organización de las moléculas de agua en la matriz extracelular por medio de los puentes de hidrógeno, alterando la solubilidad de las sustancias que interactúan con receptores proteicos. Es posible que el etanol también altere la solubilidad de algunos residuos polares de macromoléculas. Las uniones con etanol pueden desplazar todas o algunas de estas moléculas solubilizadas y alterar la interacción del receptor con el ligando o con los iones a los que son permeables. La peculiar sensibilidad de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos al etanol puede deberse a este mecanismo de solubilidad. La interacción del etanol con sus sustratos biológicos es fácilmente reversible, pues está acompañada por una energía libre muy baja (Fadda y Rossetti, 1998).

Los efectos farmacológicos del etanol son no-selectivos en el sentido de que la sustancia puede afectar la organización de las membranas, la función de las enzimas ligadas a membranas, a enzimas y proteínas involucradas en transducción de señales, canales iónicos, ionóforos acoplados a receptores, proteínas acarreadoras y la expresión de genes. Por otro lado, los efectos del etanol son específicos en la medida en que esta sustancia interactúa con sitios discretos en proteínas particulares que son críticas para el funcionamiento de las propias proteínas o de la célula (Fadda y Rossetti, 1998).

Fisiológicamente, el etanol afecta varias funciones, como son la regulación de la temperatura, la coordinación motora, el ciclo circadiano, los patrones del sueño y el comportamiento. En relación al comportamiento, el alcohol tiene efectos bifásicos que se observan tanto en animales de experimentación como en humanos. Las dosis bajas de etanol inducen estimulación locomotora en animales, lo que es equivalente a una activación psicomotora y a euforia en humanos. Las dosis altas de etanol disminuyen la actividad locomotora e inducen sedación (para revisión, ver Méndez y Herrera, 2012). La estimulación observada a dosis bajas es provocada por la supresión de funciones inhibitorias en el cerebro (Pohorecky, 1977).

Los mecanismos de la interacción del etanol con sus blancos en el SNC no han sido totalmente elucidados, pero hay evidencia contundente de que el etanol interactúa con receptores específicos en la membrana de determinadas neuronas, lo que altera su función normal. Estas interacciones perturban algunas vías de señalización en la célula, provocando alteraciones en su función dentro del sistema. Se ha encontrado que el etanol interactúa con varios sistemas de receptores de manera directa, incluyendo a los receptores ionotrópicos de glutamato, N-metil D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Möykkynen y Korpi, 2012), al receptor del ácido gama aminobutírico (GABA), GABA_A (Steven, 2006) y al receptor de serotonina 5-HT₃ (Lovinger, 1999). Además, el etanol interactúa de manera indirecta con varios receptores, incluyendo los metabotrópicos de glutamato, mGlu1 y mGlu5 (Bird y Lawrence, 2009), receptores de glicina (Chau *et al.*, 2010), de DA, D1 y D2 (Cowen, 1999; Thanos, 2001), de canabinoides, CB1 (Ortiz, 2004) y de péptidos opioides, δ y μ (Gianoulakis, 2001; Méndez y Morales-Mulia, 2008).

El GABA y el glutamato son los dos neurotransmisores que tienen la mayor proporción de células blanco en el SNC. El 90% de las neuronas centrales responden a glutamato con un incremento en la generación de potenciales de acción, por lo que el glutamato se

considera el principal neurotransmisor excitador del SNC. Por el contrario, el GABA es considerado el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, por reducir en las neuronas la probabilidad de generar potenciales de acción. Como se mencionó anteriormente, la actividad de ambos neurotransmisores se ve afectada por el etanol, es decir, el etanol tiene la propiedad de modular sistemas con efectos totalmente opuestos (excitador versus inhibitorio). La diversidad de todos los sistemas de neurotransmisores que interactúan con el etanol puede explicar la variedad de los efectos de esta droga (Hungund *et al.*, 2002).

A pesar de la gran variedad de blancos neurobiológicos y de efectos se puede considerar al etanol administrado de manera aguda como una droga depresora del SNC, por su predominancia en la activación de receptores GABA_A cuando se encuentra en concentraciones bajas y por causar la inactivación de los receptores NMDA en altas concentraciones. A nivel electrofisiológico, el GABA produce inhibición postsináptica y a nivel molecular incrementa el flujo del ion cloro (Cl⁻). Este incremento en el flujo de Cl⁻ es potenciado por el etanol. Los receptores NMDA, cuando son activados, permiten el paso de iones Na⁺ y Ca²⁺ al interior de la célula, produciendo una respuesta excitatoria postsináptica. El etanol, administrado de manera aguda, inhibe este tipo de respuestas. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se administra el etanol crónicamente su capacidad de activación de los receptores GABA_A se reduce significativamente, mientras que los receptores NMDA se activan por acción de esta sustancia. La activación de los receptores NMDA incrementa las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, hecho que puede conducir a la muerte de la célula (Albarracín-Cordero *et al.*, 2012; Davies, 2003; Nagy, 2008).

Los efectos reforzadores del etanol también dependen de varios sistemas de neurotransmisores. La DA es el neurotransmisor de mayor relevancia propuesto para el reforzamiento positivo del etanol. Las drogas de abuso como la cocaína y la fenciclidina bloquean el transportador de DA (DAT) y de esta manera incrementan la concentración extracelular de DA en el NAcc, al igual que en el estriado dorsal. El etanol también eleva los niveles extracelulares de DA en el NAcc, pero a diferencia de la cocaína, el etanol ejerce sus acciones potenciando la inhibición GABAérgica de las interneuronas inhibitorias en el ATV, lo que produce la desinhibición de las neuronas DAérgicas. El incremento en los disparos de las neuronas DAérgicas en el ATV resulta en una liberación potenciada de DA en el NAcc (Grammatopoulos *et al.*, 2010). Si se inyectan antagonistas de los receptores DAérgicos D1 y D2 en el NAcc, se reduce el consumo de alcohol y en animales que han consumido etanol de manera crónica se registran niveles elevados de DA extracelular (Czachowski *et al.*, 2001; Rassnick *et al.*, 1992).

También se ha propuesto que la modulación de los receptores de GABA_A es relevante para el reforzamiento positivo del etanol, pues los antagonistas potentes de estos receptores revierten muchos de los efectos conductuales del reforzamiento. El sitio del cerebro donde es más efectiva la reducción del consumo de etanol cuando los antagonistas son inyectados directamente, es en el núcleo central de la amígdala (Hyttia y Koob, 1995).

Hay otros sistemas neuroquímicos que median las propiedades del alcohol. Por ejemplo, si el etanol se administrada de manera aguda en dosis causantes de una intoxicación moderada, incrementa la disponibilidad sináptica de la serotonina y bloquea la recaptura de la misma. Cuando se disminuye la concentración de serotonina en el espacio

sináptico, se puede reducir el consumo de etanol; tanto inhibidores de la recaptura de la serotonina como antagonistas de los receptores de serotonina 5HT₃ producen este efecto (LeMarquand *et al.*, 1994). La activación del sistema endógeno de péptidos opiáceos también se encuentra implicada en el reforzamiento positivo de etanol. Los antagonistas opiáceos reducen la autoadministración oral de etanol en algunos modelos animales. En humanos se ha visto que algunos antagonistas opiáceos, como la naltrexona, reducen la probabilidad de que la persona retome el consumo de la droga. El núcleo central de la amígdala es particularmente sensible al efecto de estos antagonistas (Koob *et al.*, 1998).

Los mecanismos de acción del etanol involucran, por lo tanto, múltiples sistemas y blancos celulares en el SNC, afectando así la función de la mayoría, sino todos, los sistemas neuronales a nivel celular y molecular. También debe considerarse que a causa de la reversibilidad de las interacciones del etanol con sustratos neurobiológicos, las alteraciones en el funcionamiento del cerebro asociadas con el consumo crónico de etanol son el resultado de modificaciones adaptativas (plasticidad) que se producen a lo largo del tiempo. Estos cambios pueden ser de corta o larga duración pero reversibles tras un periodo de privación a la droga o pueden ser permanentes y estar asociados a procesos degenerativos en estructuras cerebrales específicas (Sullivan y Pffeferbaum, 2005).

Los sistemas de neurotransmisores con los que interviene el alcohol se verán afectados cuando la sustancia rebasa cierta concentración, siendo algunos más sensibles que otros. Las concentraciones de etanol que se alcancen en el cerebro y el tiempo que éstas se mantengan en dicho órgano son totalmente dependientes del metabolismo de la droga.

3.2. Metabolismo del alcohol

Cuando se ingiere una bebida alcohólica, el líquido llega al estómago; mientras permanece en este órgano, se puede absorber hasta un 20% de la cantidad total de alcohol. Conforme se va vaciando el estómago, el etanol pasa al intestino delgado, donde inmediatamente se absorbe el resto del etanol y es distribuido al resto del cuerpo. El etanol ingresa a los tejidos del cuerpo en proporción al contenido de agua en éstos, por lo que se encuentra una mayor cantidad de etanol en la sangre y en el cerebro que en el músculo o en el tejido adiposo. El etanol se diluye en gran medida en los fluidos corporales; por ejemplo, si se ingieren 30 ml de una bebida de alcohol al 50%, es decir, 15 ml de etanol puro, esta cantidad se diluye en una proporción de 1/5000 en un humano de 70 kg, lo que produce una concentración de alcohol en sangre (CAS) de 0.02% (Ammon *et al.*, 1996; Aragón *et al.*, 2002).

Las concentraciones de etanol en muestras biológicas presentan diversas formas de notación. Se pueden presentar en miligramos de etanol por decilitro (mg/dL), en concentraciones molares o en porcentaje (gramos de etanol contenidos en 100 ml de sangre). Una concentración 1 mM equivale aproximadamente a 4.6 mg/dl, cantidad que se representaría en términos de porcentaje como 0.0046% (Aragón *et al.*, 2002). Los niveles de alcohol en el cerebro son muy difíciles de medir, por lo que se usan los niveles de alcohol en sangre como parámetro para determinar el nivel de intoxicación. El pico de alcohol en sangre se alcanza en un tiempo aproximado de 30 min; si el estómago contiene alimentos, el vaciado de éste es más lento y se incrementa el tiempo en el que se alcanza el pico en la CAS. Por el contrario, si el estómago está vacío en el

momento de ingerir alcohol, el vaciado será inmediato y el pico en la CAS se alcanzará en un tiempo más corto (Levitt y Levitt, 1998).

Con porcentajes de 0.05% de alcohol en sangre, la mayoría de la gente comienza a presentar alteraciones mentales que producen relajación, confortabilidad y una ligera pérdida de la cautela y de la inhibición conductual. Con porcentajes de 0.1% se agudizan los trastornos mentales y se manifiestan físicamente (incapacidad de realizar movimientos finos o entorpecimiento del equilibrio). La coordinación del habla se ve comprometida con niveles de alcohol de 0.15%. Con alcohol en sangre al 0.4% la persona queda inconsciente y con dosis que produzcan porcentajes mayores a 0.5% puede suprimirse la actividad de zonas vitales del cerebro, como el centro regulador de la respiración o el latido del corazón, cosa que provoca la muerte. Para alcanzar ese porcentaje de alcohol en sangre se requeriría que un humano que pesara 70 kg consumiera en un instante 800 ml de alcohol al 50% (Grant *et al.*, 2000).

La tasa en el incremento de la CAS se ve afectada por la velocidad a la que el alcohol pasa del estómago al intestino delgado y la velocidad del metabolismo durante el paso del intestino/estómago al hígado. No todos los mamíferos presentan la misma tasa de absorción o de metabolismo de alcohol, ni tienen la misma sensibilidad a las concentraciones de etanol que alcanzan. Las CAS en ratones alcanzan un pico más elevado y en un tiempo más corto que en las ratas, pero los ratones metabolizan el alcohol de manera más eficiente, por lo que el declive de la concentración de alcohol en sangre en estos animales es muy acelerado, mientras que en las ratas va decayendo de manera más gradual. El metabolismo del etanol en la rata es muy similar al de los humanos. Los niveles de alcohol en sangre que alcanzan están directamente relacionados a las mismas dosis administradas; el tiempo que se requiere para alcanzar el pico de etanol en sangre y el grado con que éste disminuye son también muy parecidos (Livy *et al.*, 2003). En humanos, la capacidad metabólica promedio para remover el etanol del cuerpo es de 170 - 240g por día para una persona con un peso corporal de 70 kg. Esto equivaldría a una tasa metabólica promedio de 7 g/h (una bebida estándar contiene aproximadamente 7 g de etanol). Los alcohólicos consumen cantidades de etanol que oscilan entre los 200 y 300 g por día (Lands, 1998).

La principal vía metabólica mediante la cual se elimina el etanol del cuerpo inicia con la conversión de este alcohol en acetaldehído, seguida por su transformación en acetato. Los mamíferos contienen tres enzimas diferentes capaces de llevar a cabo la oxidación de etanol a acetaldehído. La de mayor importancia es la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), que se encuentra en el citoplasma de las células. Las otras enzimas capaces de metabolizar el alcohol son la catalasa (en los peroxisomas) y las isozimas CYP2E1, 1A2 y 3A4 del citocromo P450 (en el retículo endoplásmico liso) (Figura 3). El órgano en el que se lleva a cabo la mayor parte del metabolismo oxidativo del etanol es el hígado, pero también participan en este proceso algunos tejidos extrahepáticos como los riñones, el corazón, el estómago y el cerebro (Aragón *et al.*, 2002; Lands, 1998).

La ADH constituye una compleja familia de enzimas. En humanos se han categorizado cinco clases, basándose en su cinética y en sus propiedades estructurales. Las distintas clases de ADH se encuentran distribuidas de manera heterogénea entre los tejidos. Por ejemplo, en el hígado predomina la ADH clase I, mientras que en el cerebro la ADH clase III. Debido a esto, el papel de la ADH en el metabolismo del etanol será distinto dependiendo del tejido (Zakhari, 2007). El proceso de oxidación de etanol por la ADH

involucra al intermediario acarreador de electrones nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), que se reduce por dos electrones a NADH ; esto genera un ambiente citosólico reductor en las células, cosa que las hace más vulnerables al daño causado por los productos del metabolismo del etanol, como son el acetaldehído y los radicales libres (Zimatkin *et al.*, 2006) (Figura 3).

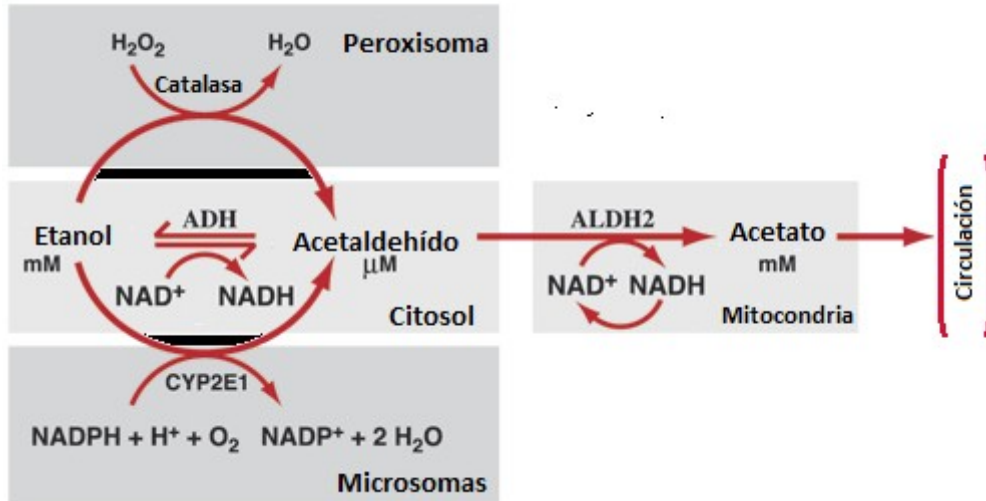


Figura 3. Vías oxidativas del etanol. ADH=Alcohol deshidrogenasa, ALDH2=Aldehído deshidrogenasa 2 (Adaptado de Zakhari, 2007).

A concentraciones cercanas a 2.5 mM el alcohol se metaboliza en el hígado a velocidades superiores que en el resto de los tejidos capaces de oxidar etanol. La causa reside en que a estas concentraciones de etanol se activan las isoformas hepáticas de ADH con K_m bajas (cercanas a 0.2 mM) así como las isoformas con K_m más elevadas (cercanas a 2 mM) (Zakhari, 2007). La mucosa gastrointestinal contiene una isoforma de la ADH que se encarga de reducir la cantidad de etanol que pasa al torrente sanguíneo. Su K_m (30.0 mM) es mayor que la K_m de las isozimas hepáticas (0.2 - 2.0 mM), pero la cantidad de sustrato disponible es suficiente para que trabaje a velocidades altas, dado que en el tracto gastrointestinal, especialmente en el estómago, el etanol se encuentra en concentraciones muy elevadas. En contraste, la ADH en el cerebro tiene una actividad mínima comparada con el resto de los tejidos, ya que su actividad oxidante se ve disminuida en una proporción de 1/4000 en comparación con la actividad hepática (Zimatkin *et al.*, 2006).

Las isozimas del citocromo P450 tienen una K_m de 8 a 10 mM. CPY2E1 es la isozima con mayor actividad oxidativa del etanol. Cuando se tienen concentraciones bajas de etanol, la enzima CPY2E1 contribuye en un 10% con el metabolismo de esta sustancia en el hígado, pero su contribución en la eliminación del etanol incrementa conforme aumentan las concentraciones de la droga, pues los niveles de estas enzimas son inducibles por su propio sustrato. Por esta misma razón, el papel de esta enzima adquiere mayor importancia en condiciones de consumo crónico de etanol. Para poder realizar la reacción de oxidación del etanol, CPY2E1 requiere NADPH y O_2 ; los productos esperados de la reacción son acetaldehído, NADP^+ , H_2O , pero también se producen especies reactivas de oxígeno, lo que incrementa el riesgo de daño en los tejidos (Lieber, 1999; Zimatkin *et al.*, 2006) (Figura 3). Las enzimas del citocromo P450 (principalmente la isozima CYP2E1) en el cerebro tienen una mayor contribución

en el metabolismo del alcohol que en el hígado. Los niveles basales de las isozimas del citocromo P450 son bajos (62 – 230 pmol/g de tejido) pero, al igual que en el hígado, son inducibles en presencia de etanol, de tal manera que los niveles de las enzimas incrementan de 10 a 20 veces (principalmente en condiciones de consumo crónico, aunque también se ha detectado un incremento de la enzima tras exposiciones agudas) (Zimatkin y Deitrich, 1997).

La catalasa en los peroxisomas es capaz de oxidar el etanol únicamente en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 3), por lo que debe estar asociada a sistemas de generación de peróxido como el complejo enzimático NADPH oxidasa (NOX) o la enzima xantina oxidasa (XOX). Los niveles endógenos de H_2O_2 son el factor limitante de la reacción catalizada por la catalasa. La oxidación del etanol mediante la catalasa es una vía menor en el metabolismo del alcohol, excepto en el cerebro y durante estados de inanición (Zakhari, 1997; Zakhari, 2007). En las células cerebrales, la catalasa lleva a cabo el 60% de la oxidación de etanol a acetaldehído. Al igual que CYP2E1, la contribución de la catalasa en el metabolismo del alcohol aumenta con el incremento de las concentraciones de la droga (Aragón *et al.*, 2002; Zimatkin y Deitrich, 1997).

La generación local de acetaldehído puede tener importantes consecuencias funcionales. Por ejemplo, esta inducción ha sido asociada con la aceleración de la lipidoperoxidación y posiblemente con los efectos tóxicos del etanol y la alteración de las membranas neuronales (Aragón *et al.*, 2002; Montoliu *et al.*, 1994). Una vez que el acetaldehído es producido por la oxidación del etanol mediante las vías anteriormente descritas, se transforma rápidamente a acetato mediante la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) en las mitocondrias. El NAD^+ participa como aceptor de electrones formando NADH. El acetaldehído tiene la capacidad de unirse a proteínas como enzimas, microtúbulos o proteínas microsomales, afectando su función. También forma aductos con la DA, produciendo salsolinol, hecho que se ha sugerido que podría contribuir a la dependencia al alcohol. Adicionalmente, forma uniones con el ADN, creando complejos carcinogénicos. En hepatocitos, la unión del acetaldehído inhibe parcialmente la secreción de proteínas, contribuyendo a la hepatomegalia (incremento en el tamaño del hígado) (Zakhari, 2007).

La mayoría del acetato que se produce en el hígado regresa a la sangre y viaja a tejidos donde se oxida a dióxido de carbono (CO_2), como en el corazón, el músculo esquelético y las células cerebrales. El acetato incrementa el flujo sanguíneo hacia el hígado y deprime al SNC. El acetato también puede ser transformado a acetil CoA en las mitocondrias del tejido nervioso (Zakhari, 2007).

Las células también pueden llevar a cabo un metabolismo no oxidativo del etanol a través de dos vías, pero a tasas muy reducidas. La primera lleva a la formación de ésteres etílicos de ácidos grasos por la reacción del alcohol con ácidos grasos. La segunda resulta en la formación de un fosfolípido llamado fosfatidil etanol. La patología y relevancia de estos productos no se han estudiado a profundidad, pero los ésteres etílicos de ácidos grasos parecen causar daño tisular (Zakhari, 2007).

Los metabolitos del alcohol y una parte del alcohol que aún no ha sido metabolizada se excretan mediante los riñones en la orina.

3.3. Neurodegeneración asociada al alcohol

3.3.1 Regiones cerebrales afectadas y neuropatologías asociadas

Desde hace tiempo se ha demostrado y reconocido que el uso excesivo de alcohol puede ocasionar daños estructurales y funcionales en regiones específicas del cerebro, así como en otros órganos. El consumo crónico de esta sustancia produce una serie de alteraciones en el organismo que conlleva al desarrollo de complicaciones médicas como cirrosis, fallas renales, trauma cerebral y desnutrición, entre otras patologías también asociadas a deficiencias vitamínicas (Fadda y Rossetti, 1998)

Se ha evidenciado una variedad de cambios neuropatológicos y morfológicos en regiones específicas del cerebro de individuos alcohólicos ha sido evidenciada mediante diversas técnicas, como análisis histológicos post mortem, imágenes de resonancia magnética (MRI) o estudios de tomografía por emisión de positrones (PET). Mediante la técnica de PET es posible detectar hipometabolismo de glucosa en las regiones más alteradas (Pfefferbaum *et al.*, 1995; Harper, 2009; Zahr *et al.*, 2011). Este tipo de estudios muestra que el cerebro de los alcohólicos se encuentra reducido en peso y en volumen. Otra anomalía asociada con el alcoholismo crónico es el incremento en el tamaño de los ventrículos. La corteza cerebral se reduce, incluyendo el ensanchamiento de los surcos y la pérdida de neuronas corticales (Figura 4) (Sullivan y Pfefferbaum, 2005; Bühler y Mann, 2011).

En términos generales, las regiones que presentan un mayor daño en alcohólicos de largo plazo comprenden el diencefalo, las estructuras de la corteza prefrontal, el tálamo e hipotálamo, las estructuras del lóbulo temporal medial (hipocampo, giro dentado, complejo subicular y cortezas perirrinal, entorrinal y parahipocampal), el prosencéfalo basal y el cerebelo. La región cortical que parece ser afectada invariablemente por el alcohol es la corteza frontal. Se sabe que los daños a estas estructuras se asocian con un amplio rango y variedad de disfunciones cognitivas y de memoria. Los perjuicios en las funciones neurológicas que se observan comúnmente en los casos de dependencia al alcohol comprenden déficits en la resolución de problemas abstractos, en el aprendizaje verbal y visual-espacial, en la función de la memoria y en habilidades y funciones motoras (Bowden *et al.*, 2001; Harper, 2009).

La severidad y la localización del daño ocasionado por el consumo de etanol depende de varios factores, entre los que se encuentran la predisposición genética a la vulnerabilidad de las células neuronales a la degeneración, el género (las mujeres tienden a presentar un daño mayor), la edad a la que se consume la droga (los cerebros de niños y adolescentes son más vulnerables que el de los adultos) y el tipo de alimentación (el daño es mayor en un estado de desnutrición), pero los factores de mayor influencia son los patrones de consumo del alcohol (frecuencia en el consumo y cantidades consumidas) y el tiempo que se mantienen estos comportamientos (Rosenbloom *et al.*, 2007; Harper, 2009; Brust, 2010).

Es posible diferenciar a los individuos considerados alcohólicos basándose en la magnitud y tipo de daños a la salud que presenten. Sin embargo, las clasificaciones que han sido propuestas son útiles bajo circunstancias específicas pero es muy difícil establecer una clasificación que contemple el estado de todas las condiciones físicas, mentales y sociales afectadas en un alcohólico. Una clasificación simple que resulta útil

para cuestiones del grado de degeneración cerebral consiste en la diferenciación de alcohólicos complicados y no complicados. Los alcohólicos no complicados son los que presentan daños neurológicos que producen los perjuicios señalados anteriormente (déficits en la resolución de algunos problemas, en el aprendizaje y la memoria y en habilidades motoras); estas personas no tienen enfermedades hepáticas ni síntomas de una patología conocida como síndrome de Wernicke-Korsakoff, pero pueden presentar deficiencias nutricionales moderadas. Los alcohólicos complicados tienen un estado de salud más deteriorado, pues presentan el síndrome de Wernicke-Korsakoff y/o problemas hepáticos serios y los perjuicios neurológicos ya mencionados están más marcados (Pfefferbaum *et al.*, 1997; Matsumoto y Matsumoto, 2008; Harper, 2009).

El síndrome de Wernicke-Korsakoff es una enfermedad neurológica asociada de manera usual con el alcoholismo. Tiene su origen en deficiencias significativas de vitamina B1 (tiamina). La fase aguda de este síndrome es la encefalopatía de Wernicke, que se caracteriza por confusión mental, discapacidad en la organización espacial, ataxia y pérdida de la memoria a corto plazo. Los síntomas de esta fase disminuyen o desaparecen con la abstinencia y la administración de altas dosis de tiamina. Alrededor del 25% de las personas que presentan la encefalopatía de Wernicke desarrollan desórdenes severos de memoria que caracterizan al síndrome o psicosis de Korsakoff. Este estado también se puede desarrollar en personas que no hayan presentado previamente el síndrome de Wernicke. Las personas con este trastorno padecen amnesia anterógrada (amnesia de eventos recientes e incapacidad de aprender y formar memoria nueva) y retrógrada (pérdida de memoria formada antes de la aparición del síndrome). Estos déficits de memoria son persistentes e irreversibles. A pesar de las deficiencias de memoria, generalmente la inteligencia no se ve afectada. Se han documentado déficits cognitivos en alcohólicos con síndrome de Korsakoff. Sin embargo, en alcohólicos que no presentan este síndrome, las deficiencias cognitivas son de grado menor si es que se presentan (Fadda y Rossetti, 1998).

La etiología del síndrome de Wernicke-Korsakoff es controversial. Algunos investigadores favorecen la teoría de que la principal causa de esta patología es la deficiencia de tiamina; otros creen que los efectos neurotóxicos directos del etanol son la causa. Incluso hay algunos que sugieren que la encefalopatía aguda de Wernicke se atribuye a los efectos de la deficiencia de tiamina, mientras que el síndrome crónico de Korsakoff se debe a la interacción de la deficiencia de tiamina con la neurotoxicidad del etanol (Oscar-Berman, 2000). Lo que sí es evidente es que los pacientes con encefalopatía de Wernicke tratados con tiamina exhiben una recuperación significativa y el estado de los pacientes con síndrome de Korsakoff mejora con ese mismo tratamiento (Zahr *et al.*, 2011).

Otros síndromes severos presentes en alcohólicos complicados incluyen la enfermedad de Marchiafava-Bignami, la mielinólisis central pontina y la degeneración cerebelosa alcohólica. La enfermedad de Marchiafava-Bignami afecta principalmente al cuerpo calloso, que se desmieliniza y causa necrosis de la lámina cortical de los lóbulos frontal y temporal. En el caso de la mielinólisis central pontina se degenera la mielina de parte o toda la base de la protuberancia en forma simétrica, lo que puede ocasionar paraplejía. La degeneración cerebelosa alcohólica afecta la porción anterior del vermis superior y áreas adyacentes de los hemisferios cerebelosos, ocasionando ataxia severa (Ozgur-Ilhan *et al.*, 2005; Brust, 2010; Zahr *et al.*, 2011).

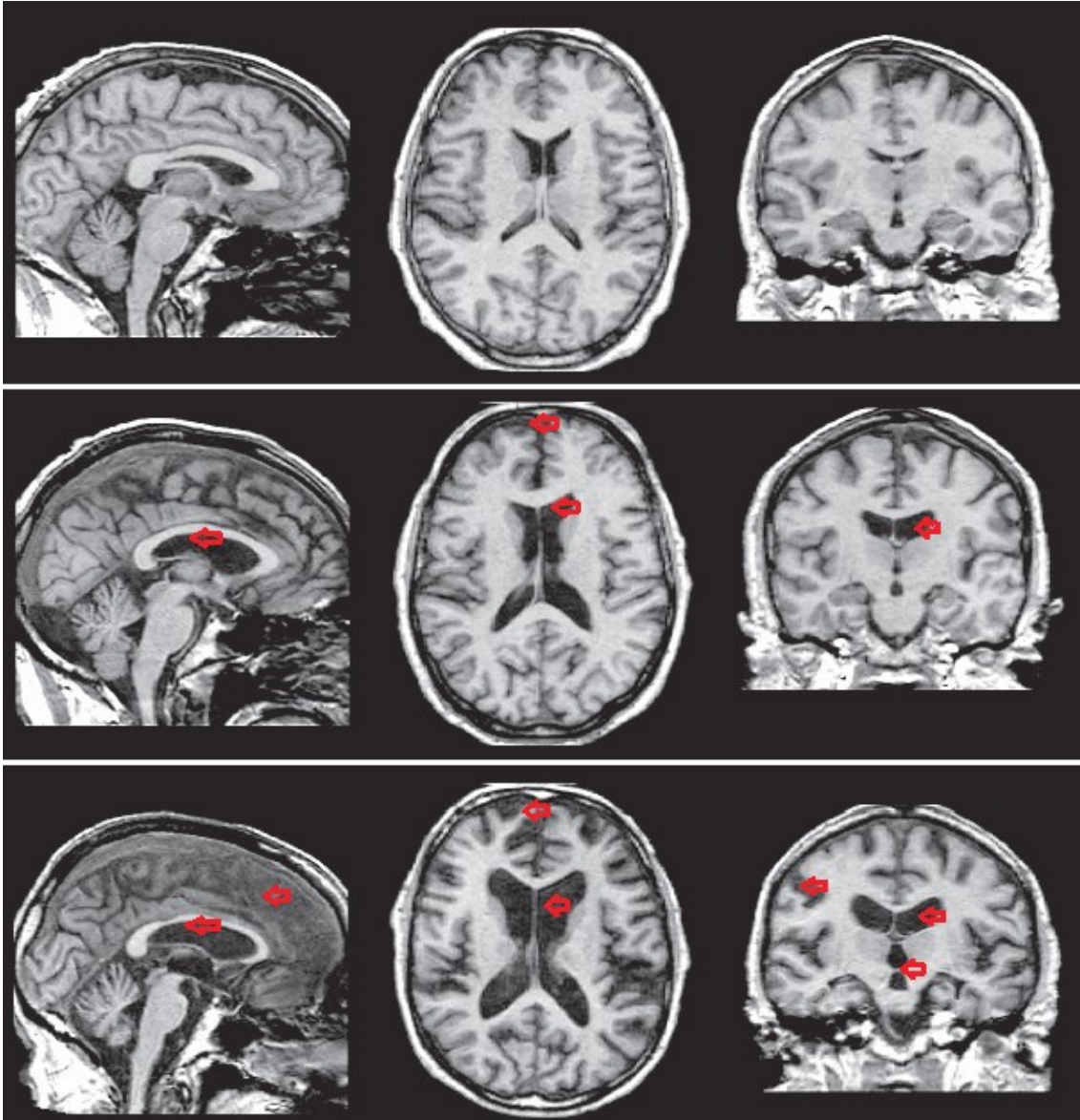


Figura 4. Imágenes de resonancia magnética (MRI) de un hombre sano de 63 años (a), un hombre alcohólico de 59 años (b) y un hombre de 63 años con síndrome de Wernicke-Korsakoff (c). La primera columna muestra una vista sagital, la segunda una vista axial y la última una coronal. Se puede observar un agrandamiento de los ventrículos en los individuos b) y c), lo que indica una reducción en el volumen del tejido nervioso. Las flechas rojas señalan los cambios más evidentes en los individuos alcohólicos en comparación con el control. (Modificada de Zahr *et al.*, 2011).

El diencefalo, que incluye dos regiones principales, el tálamo y el hipotálamo, parece ser particularmente vulnerable en alcohólicos. De hecho, las lesiones talámicas son altamente frecuentes en los pacientes con síndrome de Wernicke-Korsakoff. Los cuerpos mamilares, el hipotálamo, el núcleo talámico medial dorsal y las fibras nerviosas que los conectan son las principales estructuras que se dañan en el síndrome de Korsakoff. Los pacientes con dicho síndrome presentan un patrón de reducción en el volumen del cerebro similar al de los alcohólicos no-amnésicos, pero con una reducción significativamente mayor en ciertas estructuras específicas del diencefalo (Fadda y Rossetti, 1998).

La región del hipocampo es una de las estructuras neuronales más sensibles a los efectos crónicos y agudos de la exposición a alcohol y es una de las regiones blanco más importantes de esta droga. La actividad neuronal espontánea en el hipocampo es inhibida durante la administración aguda y sistémica de alcohol y las respuestas a la estimulación aferente del hipocampo se reducen. Los efectos del etanol parecen ser regionalmente específicos en el hipocampo (Faingold *et al.*, 2004). Los cambios estructurales y funcionales inducidos por la administración crónica de etanol en el hipocampo están extensamente documentados por la importancia de esta estructura en las funciones de memoria. El hipocampo o sus inervaciones aferentes desde el procencéfalo basal son particularmente vulnerables al efecto de la exposición crónica a etanol. En roedores, el consumo crónico de etanol resulta en un decremento en el número de neuronas piramidales en las regiones CA1 y CA3, en los sitios de sinapsis de las fibras musgosas de CA3, en las células granulares del giro dentado y en las interneuronas del circuito local. La extensión de la pérdida de neuronas se localiza en un rango del 10 al 40% de las neuronas totales (Zou *et al.*, 1996). Las neuronas del hipocampo parecen ser susceptibles a los efectos del etanol de manera diferenciada entre distintos tipos y entre el mismo tipo de células. Las células granulares en el giro dentado son más afectadas que las neuronas piramidales, pero se desconoce la causa de esta selectividad (Fadda y Rossetti, 1998).

La amnesia que se presenta en el síndrome de Korsakoff tradicionalmente era atribuida exclusivamente a las lesiones en el tálamo y en los cuerpos mamilares, pero recientemente se ha relacionado con la pérdida de volumen en el hipocampo e incluso con la banda diagonal del septo medial. Un daño moderado en el hipocampo, que por sí solo no bastaría para causar una amnesia global o incluso un importante impedimento en la memoria, podría contribuir a déficits en la memoria cuando se combina con pérdidas en volumen de otras regiones cerebrales involucradas en la memoria explícita, como los núcleos talámicos y los cuerpos mamilares (Mechtcheriakov *et al.*, 2007; Sullivan y Pfefferbaum, 2005). Los lóbulos frontales parecen ser afectados de manera más seria que otras regiones corticales. La atrofia en el lóbulo frontal es significativamente menor en alcohólicos no dementes que en los pacientes con síndrome de Korsakoff. En estudios de PET y de tomografía de emisión de fotón único realizados en alcohólicos dependientes con y sin disfunciones cognitivas, se han detectado tasas metabólicas disminuídas en la corteza, principalmente en el lóbulo frontal. También se ha revelado una reducción en el flujo de sangre regional cerebral en esta misma área (Bühler y Mann, 2011; Sullivan y Pfefferbaum, 2005).

Los únicos componentes de los ganglios basales que presentan reducción de volumen en los alcohólicos (con o sin síndrome de Korsakoff) son los núcleos caudado y putamen (Sullivan y Pfefferbaum, 2005). Se han descrito algunos casos de parkinsonismo agudo y severo durante períodos de abstinencia al alcohol después de consumos crónicos, lo que sugiere que existe una alteración en el sistema DAérgico nigroestriatal, pero este síndrome parkinsoniano es transitorio y desaparece espontáneamente después de algunos meses (Fadda y Rossetti, 1998).

Es de particular relevancia el decremento en el volumen del NAcc de alcohólicos que han bebido recientemente, lo que contrasta con los que han estado en un periodo de abstinencia de al menos un mes. De hecho, el decremento en volumen del NAcc en los primeros es mayor que el observado en pacientes con síndrome de Korsakoff (Sullivan y Pfefferbaum, 2005).

En estudios de MRI y estudios postmortem sobre la morfología gruesa del cerebro de alcohólicos se han reportado anomalías de la materia blanca en las estructuras subcorticales y en el tallo cerebral, incluyendo al vermis cerebelar, a los cuerpos mamilares, al hipocampo y al cuerpo calloso, que se adelgaza y se atrofia. Aunque las patologías en la materia blanca se reportan más comúnmente que en la materia gris, sí ocurren pérdidas neuronales pero se cree que éstas están restringidas a la corteza superior frontal (Mechtcheriakov *et al.*, 2007; Sullivan y Pfefferbaum, 2005). Estas estructuras se ven afectadas incluso en alcohólicos no complicados (Figura 4). La causa de la pérdida de materia blanca relacionada con el consumo de alcohol no ha sido elucidada del todo, pero es probable que sea provocada por alteraciones en los procesos de mielinización e integración axonal. Como la degradación de las membranas de mielina es muy rápida tras la muerte del organismo, no son posibles los estudios ultraestructurales postmortem en humanos. Sin embargo, en condiciones controladas de laboratorio es posible hacer estos estudios en animales. Por ejemplo, se ha observado que el alcohol ocasiona una pérdida permanente de grosor en el nervio óptico de la rata en desarrollo (Phillips *et al.*, 1991). También se ha observado que el consumo de alcohol combinado con deficiencia de tiamina produce un adelgazamiento del cuerpo calloso y una densidad de fibras nerviosas mayor que en animales sanos. La deficiencia de tiamina por sí sola o la administración de alcohol sin reducción de tiamina también producen cambios similares en los axones y la mielina, pero con una intensidad menor (Sullivan y Pfefferbaum, 2005; Zahr *et al.*, 2011).

A pesar del decremento en el volumen de materia blanca y gris que presentan los alcohólicos crónicos complicados y no complicados, se ha observado que los sujetos que mantienen un periodo de abstinencia presentan un retroceso significativo en el agrandamiento de los surcos corticales y de los ventrículos, al igual que un incremento en el volumen de materia blanca, lo que indica que las alteraciones mencionadas anteriormente son reversibles hasta cierto punto, aunque en ningún caso ha habido evidencia de recuperación de materia gris (Chanraud *et al.*, 2009; Sullivan y Pfefferbaum, 2005; van Eijk *et al.*, 2012). Se ha sugerido a la neurogénesis como un mecanismo que puede explicar, en parte, porqué en los alcohólicos que se abstienen de beber etanol se puede observar una recuperación significativa en el volumen cerebral y en las funciones neurofisiológicas (Pawlak *et al.*, 2002; Nixon y Crews, 2004). Contradiendo la idea que se tenía anteriormente en neurobiología, algunos estudios han mostrado que la neurogénesis puede ocurrir en ciertas regiones del cerebro adulto a lo largo de la vida del individuo. Este evento es posible gracias a la presencia de células precursoras neurales en algunas regiones específicas, que corresponden a la zona subventricular del ventrículo lateral y a la zona subgranular del hipocampo (Armstrong y Barker, 2001; Morte *et al.*, 2013; Taghipour y Razmkon, 2012). Estas células responden a señales generadas por el daño o la pérdida neuronal, existen evidencias de que dichas señales estimulan la proliferación, migración y diferenciación de las células, lo que sugiere un mecanismo de autorreparación (Álvarez-Buyla *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 1997; Ugoya y Tu, 2012). El etanol afecta la habilidad de las células precursoras de proliferar, migrar o diferenciarse, e inhibe la supervivencia de las células en la zona subventricular y la zona subgranular (Hansson *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2010; Nixon y Crews, 2002). En los alcohólicos que permiten que su organismo permanezca periodos largos de tiempo sin alcohol se puede detectar una recuperación de materia gris y una reducción de los ventrículos laterales a partir de 2-4 semanas de abstinencia (Pfefferbaum *et al.*, 1995) y a partir de un periodo de seis meses de abstinencia se puede

apreciar una ligera recuperación en la memoria de algunos sujetos (Rosenbloom *et al.*, 2007). A pesar de la gran plasticidad del cerebro, la evidencia que sostiene la recuperación del volumen cerebral debida a la proliferación celular y formación de conexiones apropiadas es muy escasa. Una interpretación más factible es que el daño cerebral ocasionado por el alcohol no es permanente (Zahr *et al.*, 2009).

3.3.2. Mecanismos de daño neuronal inducidos por el alcohol

Como se mencionó anteriormente, el etanol desencadena una gran variedad de cambios y alteraciones en las células. Estos cambios pueden dar lugar a diversas situaciones adversas o pueden activar mecanismos que conduzcan a la muerte de las células. Por lo tanto, no existe una causa única que provoque la muerte celular tras la intoxicación con alcohol. Se trata más bien de un conjunto de mecanismos cuya contribución al daño cerebral varía dependiendo de las condiciones del individuo y de los periodos durante los cuales se mantiene la exposición al alcohol. Se ha demostrado que la neurodegeneración ocurre durante los periodos de intoxicación con la droga (Collins *et al.*, 1996; Crews, 1999; Fadda y Rossetti, 1998; Harper y Matsumoto, 2005), pero también ocurre un daño significativo durante el periodo de abstinencia (Faingold *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2002; Prendergast *et al.*, 2000; Sullivan y Pfefferbaum, 2005). Los patrones de neurodegeneración son diferentes en cada etapa, al igual que los mecanismos que los provocan.

El estrés oxidativo inducido por daño mitocondrial es una importante causa de daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas y recientemente se ha demostrado que también es un factor de daño celular relevante inducido por la intoxicación por etanol (Crews, 2000b; Haroah *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2003). El estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la generación y la eliminación de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS), dando como resultado una condición en la que los niveles de oxidantes son mayores que los de antioxidantes. Las ROS y RNS a bajas concentraciones actúan como moléculas de señalización, pero su sobreproducción es dañina para la célula pues modifican químicamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Wang y Michaelis, 2010). El oxígeno tiene un gran potencial redox, lo cual es muy útil en el proceso metabólico para la generación de energía, pues funciona como el aceptor final de electrones. Sin embargo, hay moléculas de oxígeno que no se reducen completamente durante el metabolismo aeróbico. La reducción parcial de la molécula de oxígeno conduce a la generación de especies altamente reactivas, que incluyen oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido (O_2^\ominus), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\bullet) y radical peroxilo (HO_2^\bullet). Las especies reactivas de nitrógeno incluyen el óxido nítrico (NO^\bullet), dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y peroxinitrito (ONOO^\ominus). El óxido nítrico se genera por la óxido nítrico sintasa y las otras RNS son generadas por la reacción del óxido nítrico con superóxido (Crews, 2000b; Haroah *et al.*, 2008) (Figura 5).

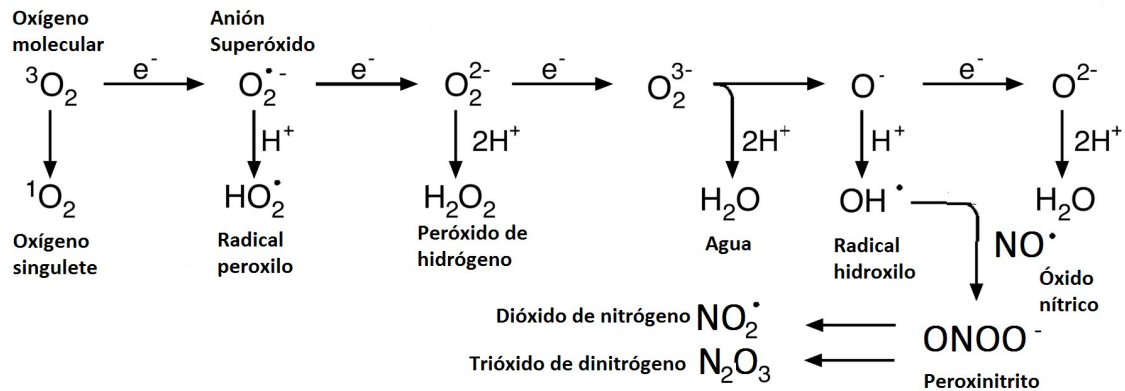


Figura 5. Generación de ROS y NOS. Modificada de Rodríguez y Redman (2005).

El metabolismo del alcohol genera ROS principalmente a partir del citocromo P450-2E1, pero también la ADH contribuye a la producción de ROS y otros oxidantes. El citocromo P450-2E1 produce H_2O_2 además de acetaldehído, mientras que la ADH produce únicamente acetaldehído. El acetaldehído aumenta la expresión de la NOX/XOX y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que conlleva a la producción de ROS y NO. Por otro lado, el H_2O_2 generado por el citocromo P450-2E1 interacciona con átomos de cobre o de hierro dando lugar a ROS mediante la reacción de Fenton-Weiss-Haber (FWH). Esta reacción consiste en la generación de OH^{\bullet} a partir de H_2O_2 y de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Adicionalmente, el citocromo P450-2E1 reduce la actividad antioxidante del glutatión y de la superóxido dismutasa (Haroah *et al.*, 2008) (Figura 6). La catalasa también es una enzima con acción antioxidante, pues utiliza el H_2O_2 como sustrato; a diferencia del glutatión y de la superóxido dismutasa, su actividad no se ve reducida en presencia de etanol (Bondy y Orozco, 1994; Yu, 1994).

Mientras que la mayoría de las neuronas tienen la capacidad de tolerar la producción de radicales libres sin ser dañadas, las neuronas de regiones específicas como las de la capa CA1 del hipocampo, las de la capa granular cerebelar, de la corteza entorrinal y las células DAérgicas de la substantia nigra son especialmente vulnerables (Wang y Michaelis, 2010).

Cuando algún factor como el estrés oxidativo rompe con la homeostasis del SNC, los astrocitos y la microglía responden a ello liberando citocinas, que se encargan de restablecer las condiciones de homeostasis y de reparar las células dañadas. Entre las citocinas liberadas se encuentran la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF α), que son del tipo pro-inflamatorio. Bajo estas condiciones también se incrementa la síntesis de ácido araquidónico, un lípido poliinsaturado que es precursor en la producción de los eicosanoides, que son, al igual que las citocinas, moléculas pro-inflamatorias. Por lo tanto, la activación continua o repetida de los astrocitos y la microglía lleva a una condición crónica de estrés inflamatorio; esto puede a su vez conducir a la sobreproducción de ROS y RNS, ocasionando una condición de estrés oxidativo más pronunciada y un mayor daño (Gemma *et al.*, 2007) (Figura 6).

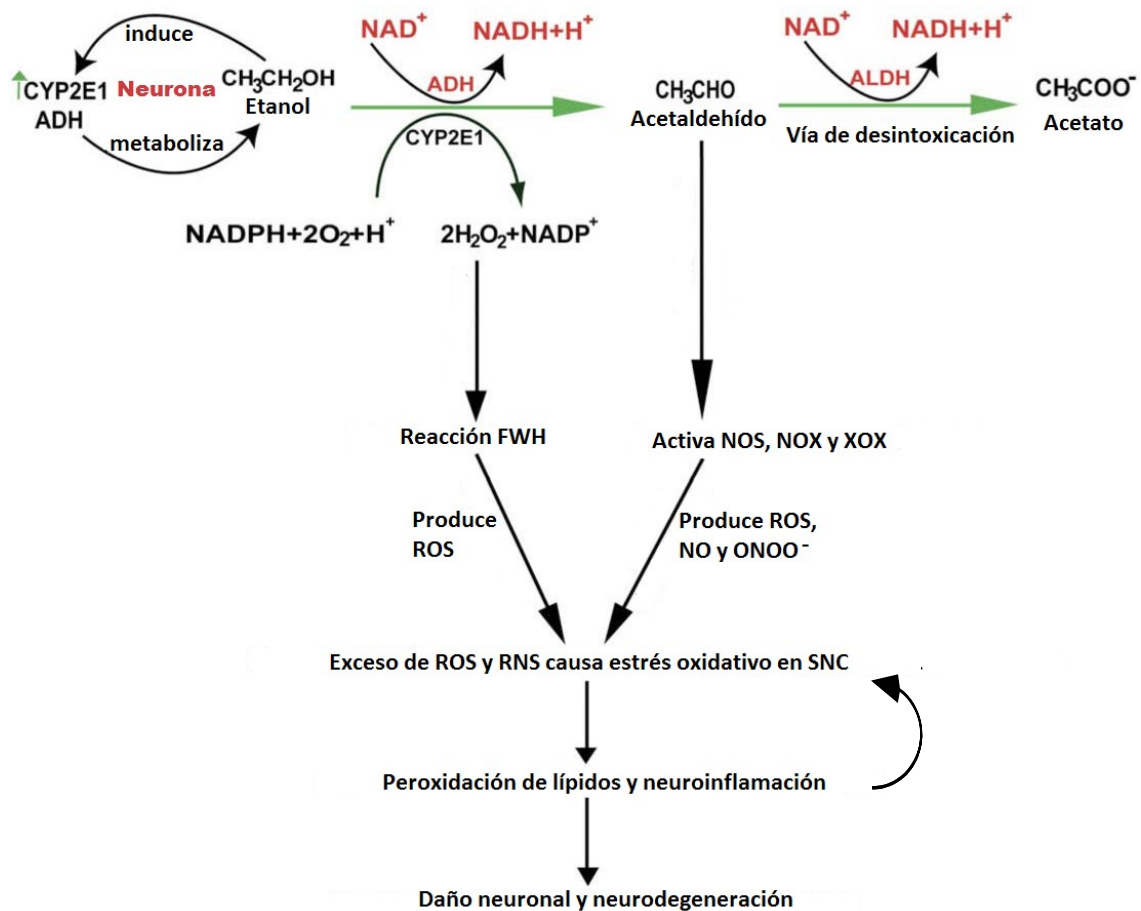


Figura 6. Estrés oxidativo derivado del metabolismo del etanol. FWH= Fenton-Weiss-Haber; NOS=Óxido nítrico sintasa; NOX=NADPH oxidasa; XO=Xantina oxidasa; ROS=Especies reactivas de oxígeno; RNS=Especies reactivas de nitrógeno. (Adaptado de Haroah, 2008).

Otra causa importante de la neurotoxicidad es el desbalance entre las señales de supervivencia y las de muerte. El etanol puede, mediante diversas vías, sobreactivar los factores promotores de muerte y suprimir algunas señales de supervivencia. El etanol induce un aumento en los niveles de glutamato y de $TNF\alpha$, sobreactivando la señalización río abajo de sus receptores y, a su vez, la acción de algunos factores de transcripción que regulan genes de muerte. El etanol también puede interactuar con otros intermediarios citoplasmáticos de las mismas vías dando como resultado una expresión alterada de genes involucrados en la supervivencia celular. Los principales genes cuya expresión es modificada a causa del etanol son la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB), el factor nuclear κ -B (NF κ B) y la proteína activadora-1 (AP-1). Generalmente, la transcripción del primero disminuye mientras que la de los dos últimos aumenta; en conjunto promueven la activación de señales de muerte y la disminución de señales de supervivencia. El etanol también puede alterar el estado de fosforilación de CREB. Cuando CREB está fosforilada, activa la transcripción de genes como bcl2 y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que mantienen la supervivencia celular. La presencia de etanol suprime la fosforilación de CREB, inhibiendo la transcripción de los genes de supervivencia celular ya mencionados (Blendy y Maldonado, 1998; Crews *et al.*, 2004) (Figura 7). CREB también es un factor que participa en la plasticidad neuronal y se ha visto que la disminución de CREB fosforilada es responsable de algunos cambios del

comportamiento adictivo como la ansiedad (Pandey *et al.*, 2003) (Figura 7). NFκB, que también puede incrementarse a causa del estrés oxidativo, regula positivamente los genes de TNFα y de NOS que promueven la muerte celular.

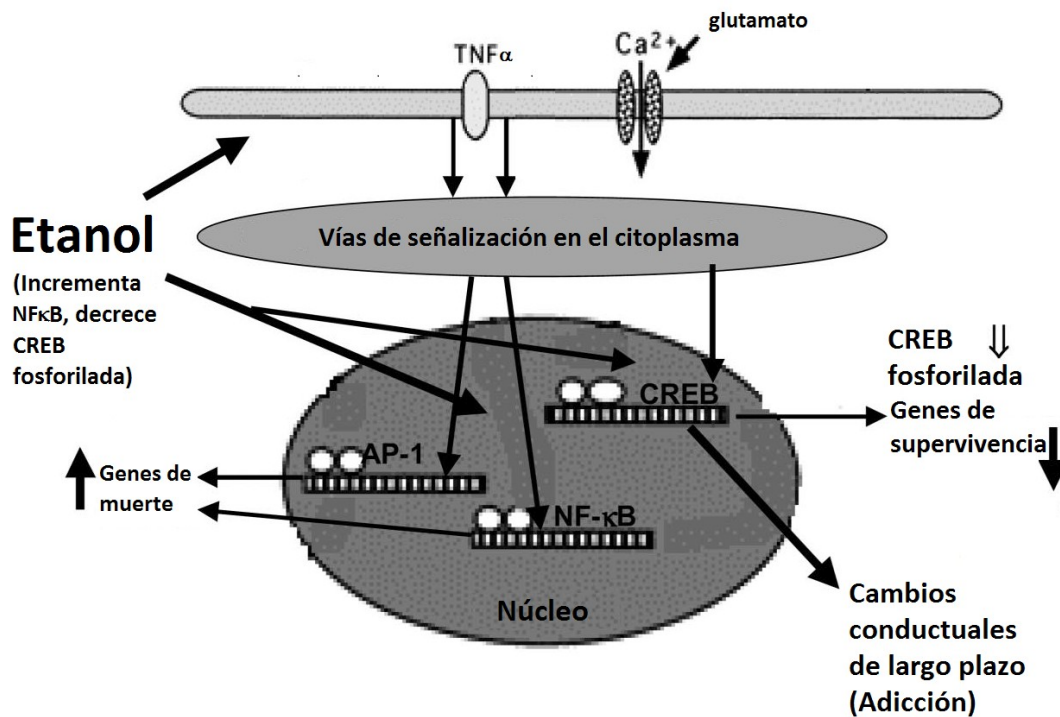


Figura 7. Acción del etanol a nivel de receptores de membrana y de factores de transcripción (Adaptada de Crews *et al.*, 2004).

Hay hipótesis que sugieren que la exposición recurrente a dosis altas de alcohol es la causa principal de la muerte celular. Los mecanismos de muerte hasta ahora descritos son más pronunciados cuando las células están expuestas a concentraciones elevadas de etanol y, si estos eventos de consumo son frecuentes, con cada repetición del acto aumenta la severidad de los mecanismos de muerte. Además, las células capaces de originar neurogénesis se encuentran constantemente inhibidas en presencia de etanol (Hansson *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2003; Nixon y Crews, 2002; Nixon y Crews, 2004). Una razón por la que el riesgo de daño cerebral aumenta si existe una alta incidencia de los eventos de consumo de alcohol es que entre cada dos eventos de intoxicación existe un periodo de abstinencia que, más que una recuperación, produce un daño mayor. Se ha reportado que el daño que ocurre durante los períodos de abstinencia al alcohol se genera primordialmente durante las primeras horas de la privación (Pfefferbaum *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 2002; Faingold *et al.*, 2004; Hughes, 2009). La causa de la muerte celular que ocurre durante periodos de abstinencia puede explicarse por una sobreactivación de los sistemas glutamatérgicos y el proceso se conoce como excitotoxicidad (Manev *et al.*, 1989; Lovinger, 1993; Hughes, 2009).

Varios estudios han demostrado que se genera un aumento importante en la cantidad de células muertas en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo y la corteza prefrontal, cuando el etanol desaparece del medio tras un evento de abstinencia a la droga tanto *in vivo* como *in vitro* (Crews *et al.*, 2004; Alfonso-Loeches y Guerri, 2011; Chen *et al.*, 2011). La inhibición continua de los receptores NMDA durante la

intoxicación con etanol conlleva a un incremento en la cantidad de glutamato presente en el espacio sináptico y a una reducción en la actividad de los sistemas de recaptura de este neurotransmisor como fenómenos de compensación. También se ha visto que durante exposiciones crónicas hay un incremento en el número de receptores NMDA (Lovinger, 1993; Freund y Anderson, 1996). En el momento en el que se abate el consumo de la droga y ésta termina de metabolizarse, los receptores a NMDA se desinhiben y el exceso de glutamato y de los mismos receptores NMDA provoca una hiperexcitabilidad en las neuronas del SNC. Con la sobreactivación de los receptores NMDA la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula alcanza concentraciones tóxicas para ésta (Lovinger, 1993). La excitotoxicidad no se genera después de administraciones agudas o subcrónicas de etanol, pues la duración de la exposición a la droga no es lo suficientemente larga para provocar cambios adaptativos, como el incremento de glutamato en el espacio sináptico o el incremento de receptores NMDA. Se ha demostrado que el daño que se llega a observar en los modelos “binge” *in vivo* ocurre durante el periodo de intoxicación y no es causa de la sobreactivación de los receptores NMDA. (Collins *et al.*, 1998; Crews *et al.*, 2004; Nixon y Crews, 2004; Obernier *et al.*, 2002), sino de algunos mecanismos mencionados anteriormente, como estrés oxidativo, activación de genes de muerte y supresión de genes de supervivencia. Es difícil definir la duración del periodo de exposición al alcohol que se necesita para ocasionar un daño tras la privación de la sustancia. Con administraciones de etanol que duran 3 o 4 días en modelos *in vivo* se ha visto una recuperación del daño durante el período de abstinencia en lugar de un incremento (Obernier *et al.*, 2002; Cippitelli *et al.*, 2010), pero con tratamientos de 7 a 10 días de neuronas en cultivo ocurre una disminución en el número de células vivas durante las primeras horas de abstinencia (hasta 16 horas después), lo que se puede deber a eventos de excitotoxicidad (Mayer *et al.*, 2002).

Los episodios de abstinencia que siguen a administraciones crónicas de dosis altas de etanol conducen primero a un estado en el que se incrementa la capacidad en la inducción de daño y después se llega a la muerte neuronal causada por la excitotoxicidad (Lovinger, 1993). Aunque la excitotoxicidad es el principal mecanismo responsable de la muerte neuronal durante la abstinencia, no es el único. Se ha visto que los cambios adaptativos que se producen en los receptores $GABA_A$ durante la exposición al etanol (disminución en el número de receptores) también contribuyen al daño de las células (Faingold *et al.*, 2002; Hughes, 2009).

Los mecanismos celulares y moleculares que dan lugar al daño inducido por etanol no se comprenden todavía en su totalidad. Además, no se pueden generalizar los mecanismos para todas las regiones cerebrales. Por ejemplo, la muerte neuronal en los cuerpos mamilares y en el tálamo está relacionado principalmente con deficiencias de tiamina, mientras que el daño hipocampal y cortical está más relacionado a los efectos neurotóxicos del alcohol (estrés oxidativo y activación de vías de señalización de muerte) y de la abstinencia a la sustancia (excitotoxicidad) (Crews *et al.*, 2004; Fulton, *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2009). Adicionalmente, existen otros factores que influyen en la sensibilidad de las neuronas al daño como la composición de la membrana celular (Chen *et al.*, 2000; Beauge *et al.*, 1988). También se ha sugerido que la DA es un neurotransmisor que puede proteger a las células de los efectos tóxicos del etanol, por lo que las regiones con gran actividad DAérgica son menos vulnerables a este tipo de daño (Delis *et al.*, 2012). De la misma manera, las regiones con una alta actividad de acetilcolina se han asociado a un incremento en el daño ocasionado por el alcohol (Arendt, *et al.* 1988; Sullivan y Pefferbaum 2005).

3.3.3. Factores implicados en los efectos neurodegenerativos del alcohol en modelos animales

Aunque el daño neuronal pueda correlacionarse con la cantidad total de etanol administrada, el tipo de protocolo del tratamiento es un factor importante en el desarrollo de las alteraciones neurodegenerativas. Los niveles de etanol que puede alcanzar el organismo, el tiempo que estos niveles se mantienen elevados, la frecuencia con la cual se repiten los eventos de intoxicación y la cantidad y duración de los periodos de abstinencia son factores cruciales para determinar la magnitud del daño neuronal y las áreas donde éste se presenta.

En roedores, los niveles de alcohol en sangre que se alcancen y las variaciones que éstos tengan en función del tiempo se ven afectados por un gran número de factores, como son el tipo de cepa de los animales, su edad, el género, la vía de administración del alcohol, la concentración de la solución que contiene la droga, el estado prandial, la duración del tratamiento y la dosis administrada (Bielawski y Abel, 2002). La vía de administración del etanol es importante para determinar el pico máximo de concentración de alcohol en sangre y el tiempo en el que éste se alcanza. Si la misma cantidad de etanol es administrada intragástrica o intraperitonealmente, la concentración de alcohol en sangre será mayor en los animales que recibieron etanol por vía intraperitoneal y el pico máximo en esta concentración se alcanzará en un menor tiempo (Ogilvie *et al.*, 1997). Esto se debe a que el etanol administrado intragástricamente tiene oportunidad de comenzar a ser metabolizado por la ADH gástrica y la absorción de la sustancia en el estómago es mínima comparada con la absorción intestinal. Además de la vía de administración del alcohol, el tiempo en el que se distribuye la dosificación de la sustancia es otro factor que determina las CAS que alcanzará el organismo. Entre mayor sea el tiempo en el que se distribuya determinada dosis de etanol, menores serán las CAS que se detecten. De hecho, hay evidencia de que en los patrones de consumo “binge” las dosis de etanol requeridas para alcanzar CAS capaces de provocar daño cerebral en ratas no necesitan ser tan altas como en otros modelos de consumo, debido a que las dosis completas de etanol se administra aceleradamente y de manera continua (Fadda y Rossetti, 1998). En ratas con este tipo de tratamientos subcrónicos (alrededor de 3 días) con altas dosis intoxicantes de etanol, se han reportado alteraciones neuropatológicas en las regiones hipocampales y corticales (Zou *et al.*, 1996). Sin embargo, las alteraciones más pronunciadas se producen a partir de tratamientos crónicos prolongados, siempre y cuando las dosis administradas sean lo suficientemente elevadas para incrementar los niveles de alcohol en sangre a un grado intoxicante.

Existe un conjunto de estudios de administración de etanol *in vivo* realizados en roedores en los que los periodos de exposición a la droga y el daño reportado por esta causa son variados y proporcionan información útil para esclarecer las circunstancias bajo las cuales el daño es más significativo. Después de 4 meses de tratamiento con dieta líquida de etanol al 9% se ha detectado una reducción en las células hipocampales de la región CA1 y de sus sinapsis (Phillips y Cragg, 1983), tras 7 meses de administración de dieta líquida de etanol al 12% se han observado defectos en la recaptura de acetilcolina en la región hipocampal (Beracochea *et al.*, 1986), y con 12 meses de consumo de etanol al 22% se ha detectado una pérdida de neuronas colinérgicas en varias regiones, siendo el cerebro anterior basal, el septo medial y la banda diagonal de Broca las más afectadas (Arendt *et al.*, 1988). Sin embargo, también

se ha visto que se puede desarrollar daño hipocampal después de tan solo un mes de administración intraperitoneal intermitente (dos veces al día) de etanol con dosis de 3g/kg (Lundqvist *et al.*, 1995) o incluso después de 3-4 días de administración intragástrica forzada de dosis (3-5 g/kg) con intervalos cortos. Algunos estudios han mostrado que este tratamiento tipo “binge” de administración forzada por medio de una cánula intragástrica produce neurodegeneración en áreas corticolímbicas, incluyendo al giro dentado y al bulbo olfatorio (Crews *et al.*, 2000, Collins *et al.*, 1998). Otros estudios realizados de igual manera reportan daño en áreas similares, con excepción del bulbo olfatorio (Herrera *et al.*, 2003), mientras que existen otros reportes de neurodegeneración en la corteza entorrinal y perirrinal en conjunto con el bulbo olfatorio (Obernier *et al.*, 2002).

No sólo se ha observado daño cerebral durante los períodos de administración de alcohol. Algunos estudios han mostrado un aumento en el daño tras cortos periodos de abstinencia, aunque existen discrepancias en los diversos reportes respecto al tema. Se ha mostrado que la magnitud del daño en las cortezas entorrinal y perirrinal en ratas Sprague-Dawley adultas es mayor justo después de la última dosis del cuarto día de administración “binge”, y disminuye con 16 y 72 horas de abstinencia, mientras que después de un periodo de 7 días de abstinencia el daño prácticamente desaparece (Crews *et al.*, 2000; Obernier *et al.*, 2002b). En un tratamiento “binge” similar con ratas más jóvenes y con concentraciones menores de alcohol en sangre se detecta una degeneración necrótica en pocas regiones cerebrales después de dos días de exposición; después de 4 días de tratamiento, el daño se detecta en la corteza agranular insular, corteza piriforme, entorrinal y perirrinal y en el giro dentado. Cuando las ratas permanecen 3 días en abstinencia se detecta una disminución del daño casi en su totalidad (Obernier *et al.*, 2002). Algunos estudios han encontrado daño entre 8 y 36 h después de la última dosis de etanol que se administró en un tratamiento “binge” (Collins *et al.*, 1996; Switzer III, 2000), con una tendencia a la reducción de daño en el tiempo de mayor duración. La degeneración visualizada por tinción de plata aparece aproximadamente entre las 36 y 48 h después de la última dosis. En conjunto estos datos sugieren que la neurodegeneración ocasionada por patrones de consumo tipo “binge” ocurre durante la intoxicación, y las neuronas ya muertas pueden detectarse algunas horas después de este periodo.

La variedad de protocolos utilizados como modelos de alcoholismo en animales es muy amplia al igual que los resultados obtenidos, existiendo incluso contradicciones en reportes realizados por distintos grupos de investigadores (i.e., Cippitelli *et al.*, 2009; Obernier *et al.*, 2002). Por eso, es preciso realizar experimentos que proporcionen información suplementaria a los datos ya reportados para tener un conocimiento más amplio sobre los efectos neurodegenerativos del etanol.

4. Justificación

Existe un gran número de estudios en los que se ha mostrado que entre mayor es la cantidad de alcohol ingerida y mayor es el tiempo de exposición a la sustancia, aumenta la severidad y la extensión del daño en el cerebro (Fadda y Rossetti, 1998; Koob, 1999; Obernier *et al.*, 2002; Sullivan y Pfefferbaum, 2005; Zahr *et al.*, 2009; Zahr *et al.*, 2011). Con estos mismos estudios se ha advertido que las regiones cerebrales presentan diferente vulnerabilidad a los efectos neurodegenerativos del

etanol, por lo que hay zonas que se ven inmediatamente afectadas con dosis moderadas de etanol o tiempos cortos de exposición a la droga, mientras que otras áreas no muestran daño a pesar de estar continuamente expuestas a cantidades elevadas de la sustancia. Las regiones más vulnerables al daño provocado por etanol han sido identificadas en diversos estudios. Estas áreas comprenden algunas zonas corticales, como la corteza frontal, piriforme, perirrinal y entorrinal, las regiones CA1, CA3 y el septo medial del hipocampo, el bulbo olfatorio y el cerebelo (Lundqvist *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1998; Fadda y Rossetti, 1998; Crews *et al.*, 2000; Obernier *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2003; Zahr *et al.*, 2009). De estas regiones, la corteza frontal y el bulbo olfatorio son estructuras que forman parte del sistema DAérgico mesolímbico. Sin embargo, el ATV, el NAcc y la amígdala son estructuras que forman parte de este sistema en las que la vulnerabilidad al etanol es controversial.

Son escasos los estudios de evaluación de daño inducido por alcohol en los que se reporta un análisis de los efectos degenerativos del alcohol en todas las áreas cerebrales (Cippitelli *et al.*, 2010). Generalmente, los estudios se han enfocado exclusivamente en las regiones previamente descritas como las más vulnerables y se ha dejado de lado el resto de las estructuras.

Debido al importante papel que juega el sistema DAérgico mesolímbico en las vías de recompensa y de reforzamiento del etanol (tema de estudio central del laboratorio en el que se realizó el presente trabajo) resulta interesante realizar un estudio que se enfoque en el daño neuronal de las estructuras que componen al sistema DAérgico mesolímbico para esclarecer la controversia existente en cuanto a su susceptibilidad a la neurodegeneración ocasionada por el etanol.

5. Hipótesis

Debido a que las estructuras del sistema DAérgico mesocorticolímbico están constantemente perturbadas en presencia de etanol, es posible que con ciertos patrones de administración crónica y/o subcrónica de la droga se vea comprometida la integridad de estas estructuras

6. Objetivo

Evaluar histológicamente los efectos degenerativos de la administración crónica y subcrónica de alcohol sobre las diferentes regiones del cerebro de la rata.

6.1. Objetivos específicos

- Examinar histológicamente las regiones cerebrales que integran el circuito de reforzamiento del alcohol (i.e., sistema DAérgico mesocorticolímbico y amígdala) del cerebro de ratas previamente tratadas con alcohol y hacer una evaluación de la integridad celular en estas estructuras.
- Identificar histológicamente la presencia de daño celular en las regiones cerebrales que no formen parte del circuito DAérgico mesocorticolímbico.
- Evaluar el estado de intoxicación de los animales tratados crónica y subcrónicamente con etanol de acuerdo con sus concentraciones en sangre.

7. Métodos

7.1. Tratamiento de los animales

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas macho Wistar de edad adulta (con un peso de 180-200 g para el tratamiento crónico y de 160-210 g para el tratamiento subcrónico), que fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los animales se trataron de acuerdo al reglamento del Comité de Ética del instituto. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-obscuridad con duración de 12 h para cada periodo: las luces se encendían a las 7:00 h y se apagaban a las 19:00 h. Se les proporcionó como única fuente de alimento “pellets” Purina-chow suministrados por el instituto.

Se establecieron dos protocolos distintos para la administración de etanol. El primero consistió en un tratamiento de tipo crónico y el segundo en un tratamiento subcrónico.

7.1.1. *Tratamiento crónico.*

El primer tratamiento de administración crónica de etanol tuvo una duración de 30 días. Los animales se acomodaron en cajas individuales donde tenían una solución de etanol al 10% (v/v) como única opción de líquido para beber y tenían libre acceso al alimento. Las ratas que se utilizaron como control tenían libre acceso a agua y alimento durante todo el tratamiento (*grupo ad libitum*). El peso de los animales y la cantidad de líquido y alimento consumido por cada uno se monitoreó diariamente hasta la finalización del tratamiento. El grupo de animales tratado con etanol consistió de 8 ratas y un grupo de igual tamaño se utilizó para el tratamiento control.

Las ratas se sacrificaron por decapitación 0, 24 y 48 h después del 30º día de tratamiento para tener un grupo de animales sin privación al alcohol (0 h), uno con un día como periodo de privación (24 h) y otro con dos días de abstinencia a la droga (48 h). Durante los periodos de privación de etanol, se permitió el libre acceso al agua y al alimento. Se recolectó la sangre troncal de cada rata e inmediatamente se extrajeron los cerebros, que se colocaron sobre hielo seco para una rápida congelación. Los cerebros se trasladaron después a una temperatura de -70°C para su almacenamiento.

7.1.2. *Tratamiento subcrónico.*

El segundo tratamiento realizado, que consistió en un modelo de administración tipo “binge”, por su corta duración en comparación a los tratamientos catalogados como crónicos (que duran generalmente desde 10 días hasta 12 meses en modelos animales) (Fadda y Rossetti, 1998; Crews *et al.*, 2004), se clasifica de duración subcrónica. Consistió en la administración repetida de alcohol durante 4 días. Las ratas se mantuvieron en grupos de cinco animales por caja y cada 8 h (tres veces al día) recibieron una inyección intraperitoneal de una solución de etanol al 20% en agua; la dosis administrada a cada animal por inyección correspondió a 3g/kg de etanol. Los animales control recibieron solución salina de 0.9% de NaCl en las inyecciones intraperitoneales.

Tras recibir la duodécima (última) inyección, las ratas se sacrificaron por decapitación 1, 4, 8 y 24 h después. De igual manera que en el tratamiento anterior, la sangre troncal fue recolectada y los cerebros congelados.

Se utilizó un segundo grupo de ratas sometidas al tratamiento tipo “binge” para poder conocer los niveles de alcohol en sangre que se alcanzaban durante el tratamiento. Para esto, se recolectó la sangre troncal de las ratas en diferentes momentos del tratamiento. Las muestras de sangre se obtuvieron una hora antes y una hora después de la tercera (primer día), sexta (segundo día), novena (tercer día) y duodécima (cuarto día) inyección.

7.2. Tratamiento del tejido

De los cerebros de las ratas se obtuvieron cortes coronales de 20µm de grosor, iniciando en Bregma 5.70 mm y terminando en Bregma -6.80 mm. Los cortes del tejido se realizaron en un criostato (Leika CM3050) a temperaturas entre -18°C y -20°C y se adhirieron en forma seriada a portaobjetos previamente gelatinizados; en cada portaobjetos había tres o cuatro niveles de corte distintos. Una vez terminado de cortar el cerebro, los portaobjetos se almacenaron a -70°C y se mantuvieron a esa temperatura hasta realizar los análisis histológicos. Las tinciones histológicas que se aplicaron en los cortes fueron violeta de cresilo y Fluoro-Jade B (Chemicon) / 4',6-Diamidino-2-Fenilindol Dilactato (DAPI) (Sigma-Aldrich).

Las tinciones con violeta de cresilo (Paxinos y Watson, 2005) se utilizaron para examinar la integridad del tejido, mientras que la tinción realizada con Fluoro-Jade B y DAPI (Modificado de Chemicon, 2013; Invitrogen, 2006) se utilizó para marcar las células que se encontraban en proceso de degeneración en el momento del sacrificio del animal (Fluoro-Jade B) y marcar los núcleos de todas las células del tejido (DAPI). De esta manera se pudo conocer la razón entre células en degeneración y células totales.

El número de cortes analizado fue de 28 a 35 cortes por cerebro, cada sección equivalía a un nivel de corte diferente; aproximadamente desde Bregma 5.20 hasta Bregma -6.80. De cada sección se examinó bajo el microscopio el 100% del área, identificando las regiones en las que se encontraran células positivas a Fluoro-Jade B.

7.3. Procedimientos de tinción

Para poder comenzar con la tinción, el tejido debe encontrarse a temperatura ambiente y los cambios de temperatura deben hacerse de manera gradual. Primero se transfieren de -70°C a -20°C y permanecen en el congelador de -20°C durante toda una noche. Posteriormente se pasan a un refrigerador a 4°C y se mantienen a esa temperatura por una hora. Finalmente, se sacan del refrigerador y la adaptación a temperatura ambiente ocurre en 5 min.

La preparación de las soluciones que se requieren para todas las tinciones se describe en el la sección del Anexo.

7.3.1. Tinción con violeta de cresilo

Los cortes a temperatura ambiente se hidratan en agua destilada durante 5 min. Luego se fijan en paraformaldehído al 4 % durante 20 min. Transcurrido ese tiempo se lavan en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), dos veces a tiempos de 5 min. Después se tiñen con violeta de cresilo de 2 a 3 min. Después se lavan en agua destilada dos veces durante 1 min y se deshidratan en varias soluciones de alcohol en forma seriada (60%, 80%, 95 % y alcohol absoluto) durante 15 seg cada una. Finalmente, se

dejan secar y se introducen en xilol por 5 min. Se montan en bálsamo de Canadá o en medio de montaje Permout (Fisher Scientific).

7.3.2. Tinción de Fluoro-Jade B / DAPI

El Fluoro-Jade B es un colorante que emite una fluorescencia de color verde; su pico de excitación es de 480 nm y el de emisión es de 525 nm. Es un compuesto polianiónico derivado de la fluoresceína, por lo que la identidad bioquímica de las moléculas a las que podría unirse es de múltiples grupos cargados positivamente, como es el caso de las poliaminas. Ensayos *in vitro* han identificado varias moléculas con una fuerte atracción electrostática al Fluoro-Jade B, como las poliaminas aminopropil-butanodiamina (espermidina), diaminobutano (putrescina), y diaminopentano (cadaverina) (Schmued, 2000). Sin embargo, aún no se sabe si en las células en degeneración son estas moléculas el blanco del Fluoro-Jade B. Se tiene la seguridad de que la molécula que se une al Fluoro-Jade B en neuronas en degeneración es citosólica y sólo está presente durante el proceso de muerte de la célula, indistintamente del mecanismo que esté ocasionando la muerte (Schmued, 2000; Chemicon, 2013).

El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es una molécula que se une al ADN de las células y fluoresce en azul. Su sitio de unión en la cadena de ADN son los surcos menores de las regiones ricas en A-T (Invitrogen, 2006).

Los cuerpos verdes fluorescentes marcados por el Fluoro-Jade B deberían representar los somas de las células que se encuentran en degeneración. Sin embargo, no todas las marcas verdes que se observen pertenecerán a cuerpos celulares. El DAPI, que marca los núcleos de las células, sirve como guía para identificar los falsos positivos: si se identifica un soma verde que no se empalma con la marca azul correspondiente al núcleo, es altamente probable que el elemento en cuestión no sea una célula.

Para iniciar la tinción debe deshidratarse el tejido. Para esto se introducen los cortes en un horno a 50°C y se mantienen ahí por 30 min. Después, los cortes se sumergen en alcohol al 80% por 5 min, tras lo cual permanecen en alcohol al 70% por 2 min. Se realiza un lavado con agua destilada y se cubren con permanganato de potasio al 0.06% por 10 min, manteniéndolos con un movimiento continuo y suave para producir una tinción de fondo homogénea. Se vuelve a realizar un lavado con agua destilada y los portaobjetos se cubren con la solución de Fluoro-Jade B 0.0004% / DAPI 0.0001% en ácido acético al 0.1% y se mantienen en obscuridad durante 20 min. Transcurrido este tiempo se realiza un último lavado con agua destilada. Los cortes se dejan secar y nuevamente se introducen en un horno a 50°C por uno o dos min. Para finalizar, los cortes se sumergen en xilol durante 2 min y se montan con Permout (Sigma-Aldrich). El tejido teñido debe examinarse bajo un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 450-490 nm para Fluoro-Jade y de 358 nm para DAPI. El microscopio utilizado fue Olympus BX51.

7.4. Determinación de alcohol en sangre

7.4.1. *Obtención del plasma sanguíneo*

Para la obtención de plasma sanguíneo y desproteización de las muestras se siguieron las indicaciones señaladas en el del Kit 332-B de Sigma para la determinación enzimática de etanol (Procedimiento No. 332-UV).

Se agregaron 4 ml de sangre troncal a tubos Falcon de 10 ml que contenían 4 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 12 mM (Sigma-Aldrich), de forma que la proporción de EDTA y de sangre fue 1:1, teniendo una concentración final de EDTA de 6 mM. Las mezclas se agitaron suavemente por unos seg, tras lo cual se centrifugaron por 30 min a 3000 rpm manteniendo la temperatura a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante, que corresponde al plasma sanguíneo. El plasma se almacenó a -70°C hasta realizar el ensayo de cuantificación de niveles de alcohol.

7.4.2. *Desproteización de las muestras*

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se añaden 300 µL de plasma sanguíneo y 450 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0.38N, y se mezcla la solución con un vórtex. Se incuba durante 5 min a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante de color claro. En caso de ser necesario (si el sobrenadante está turbio y con color), se repite el procedimiento. El plasma debe tener una tonalidad muy cercana a transparente.

7.4.3. *Principio para la determinación de la concentración de alcohol en sangre*

Para conocer los niveles de alcohol en la sangre obtenida de los animales, se utilizó el método enzimático de la alcohol deshidrogenasa (ADH) (Sigma-Aldrich) (Poklis y Mackell, 1982). El fundamento de este método es el siguiente:

La enzima alcohol deshidrogenasa oxida el etanol en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (Sigma-Aldrich), dando como resultado acetaldehído, NADH (la forma reducida de NAD) e H⁺



Para esta reacción la constante de Michaelis (Km) equivale a una concentración del sustrato de 2.1×10^{-3} M. Una unidad de ADH transforma 1.0 µmol de etanol en acetaldehído por min a un pH de 8.8 a 25°C. Por lo tanto, el análisis de determinación de alcohol en sangre se realiza a temperatura ambiente y se utiliza un buffer de glicina e hidracina (Sigma-Aldrich) para mantener el pH entre 8.5 y 9. La concentración inicial de NAD⁺ en la reacción no debe exceder de 1.9 nmol/l (Poklis y Mackell, 1982).

El análisis consiste en agregar una cantidad determinada de la enzima (ADH) y de NAD⁺ a una muestra del plasma sanguíneo obtenido y determinar la cantidad de NADH producido en la reacción mediante espectrofotometría. El NADH tiene una absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Para llevar a cabo el ensayo se procedió de la siguiente manera:

7.4.4. Preparación de la curva estándar de alcohol.

Se prepara una curva estándar con concentraciones conocidas de etanol. En cada vial se agregan 2.8 ml de buffer glicina-hidracina 0.5 M, 1194.12 μg de NAD^+ diluidos en 100 μl de buffer glicina-hidracina y 0.3 mg de ADH diluida en 100 μl de buffer glicina-hidracina. Se agrega a los viales una cantidad conocida y ascendente de solución estándar de etanol 0.08% en las proporciones que se indican en la tabla. La solución que será usada como blanco tiene 10 μL de agua destilada en lugar de EtOH. Cada concentración de etanol de la curva estándar se mide por triplicado.

-
-

mg/dL	EtOH 0.08% (μL)	NAD-glicina-hidracina (μL)	ADH-glicina-hidracina (μL)	Buffer glicina-hidracina (mL)
5	0.625*	100	100	2.8
10	1.25*			
20	2.5			
40	5.0			
60	7.5			
80	10			
120	15			
160	20			
240	30			
320	40			
BLANCO	10 μL H_2O			

*Estos volúmenes no se pueden pipetear directamente, por lo que se deben preparar diluciones con volúmenes mayores y proporcionales para tener los mg/dl deseados.

7.4.5. Cuantificación de la concentración de alcohol en plasma.

Las mismas soluciones de NAD^+ , ADH y buffer de glicina-hidracina que fueron utilizadas para preparar la curva estándar, se usan en los viales que contendrán las muestras de plasma de los animales tratados con etanol, y se utilizan las mismas cantidades, como se muestra en la tabla. Cada muestra se prepara en triplicado.

Plasma (μL)	NAD-glicina-hidracina (μL)	ADH-glicina-hidracina (μL)	Buffer glicina-hidracina (mL)
100	100	100	2.7

El rango de tiempo que debe transcurrir a partir de la adición de etanol a los viales de la curva estándar y de las muestras de plasma está entre 30 y 45 min antes de tomar las lecturas. Una vez concluido el tiempo de reacción que fue establecido, se registra la lectura a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, BioMate3), comenzando por el triplicado de la curva estándar con la concentración menor de EtOH.

Para cada concentración de etanol se hace un promedio de las lecturas de los triplicados y con esos datos se construye una gráfica que expresa la relación entre concentración de etanol (ya conocida) y absorbancia a 340 nm y se realiza una regresión lineal con los puntos obtenidos en dicha gráfica. Con las absorbancias de los triplicados de cada muestra también se realiza un promedio y por medio de la curva estándar se correlaciona dicho resultado con una concentración de EtOH determinada.

7.5. Cuantificación de células en degeneración

Se determinaron dos maneras de expresar el número de células positivas al colorante fluorescente Fluoro-Jade B identificadas en los cortes examinados. La primera consistió en calcular el área (mm^2) de la región cerebral en la que se identificaron células positivas a FluoroJade B y expresar la cantidad de células verdes fluorescentes identificadas por mm^2 de la región. El cálculo del área de cada región en la que se encontraron células fluorescentes consistió en identificar dicha región en cada nivel de corte que se examinó del cerebro en cuestión y medir su extensión. Luego se sumaron las áreas de cada nivel de corte y el resultado fue el dato utilizado para la expresión de #células/ mm^2 . Dado que las secciones revisadas de cada cerebro no corresponden al mismo nivel de corte, el área total examinada para cada cerebro no fue exactamente la misma. Por lo tanto, se recurrió a una segunda forma de expresar la cantidad de células positivas a Fluoro-Jade B encontradas; ésta consistió en contar el número total de núcleos teñidos con DAPI que se observaban en el campo de visión del microscopio, teniendo así el total de células en esa porción del tejido. Se seleccionaron cuatro campos de visión distintos dentro de la región de interés y se sacó un promedio del número de células que se contaron en cada uno; con este dato se aproximó el número de células totales que habría en el área total examinada de cada región con células positivas a Fluoro-Jade B. El dato final se expresó como porcentaje de células positivas a Fluoro-Jade B con respecto al total de células por región.

Las dimensiones del cerebro de la rata utilizadas para calcular el área de las regiones cerebrales de interés fueron obtenidas de la literatura (Sahin 2001; Paxinos & Watson 2005).

7.6. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos al cuantificar las células positivas a Fluoro-Jade no pudieron someterse a ninguna prueba estadística por la falta de correlación de las regiones con células positivas a Fluoro-Jade entre los distintos cerebros y por la escasez de células fluorescentes.

Para el análisis de los datos de concentración de alcohol en el plasma sanguíneo se utilizó un ANOVA de dos vías. En el tratamiento crónico se consideraron el tratamiento y la condición post-tratamiento como fuentes de variación. Para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba post hoc de Tukey-HSD. Para el tratamiento subcrónico se obtuvieron dos grupos de datos que se analizaron por separado. El primer grupo contenía los datos del tiempo transcurrido después de la última inyección en el momento del sacrificio para el grupo etanol y el grupo control. En este caso, se consideraron el tratamiento y el tiempo posterior a la última inyección como fuentes de variación. Se utilizó la prueba post hoc de Tukey-HSD para determinar las diferencias entre grupos. El segundo grupo de datos del tratamiento subcrónico consistió en los

valores de alcohol en sangre determinados durante el tratamiento 1 h antes y 1 h después de la administración intraperitoneal de etanol. Los factores de variación en este caso fueron el día del tratamiento y el momento de la toma de muestra (antes o después de la inyección de etanol). Para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba post hoc de Tukey-HSD. En todos los casos se tomaron como significativos valores de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1. Integridad del tejido nervioso

Las tinciones con violeta de cresilo mostraron que el tejido se encontraba bien preservado, con una cantidad mínima de grietas, que no comprometen la integridad estructural.

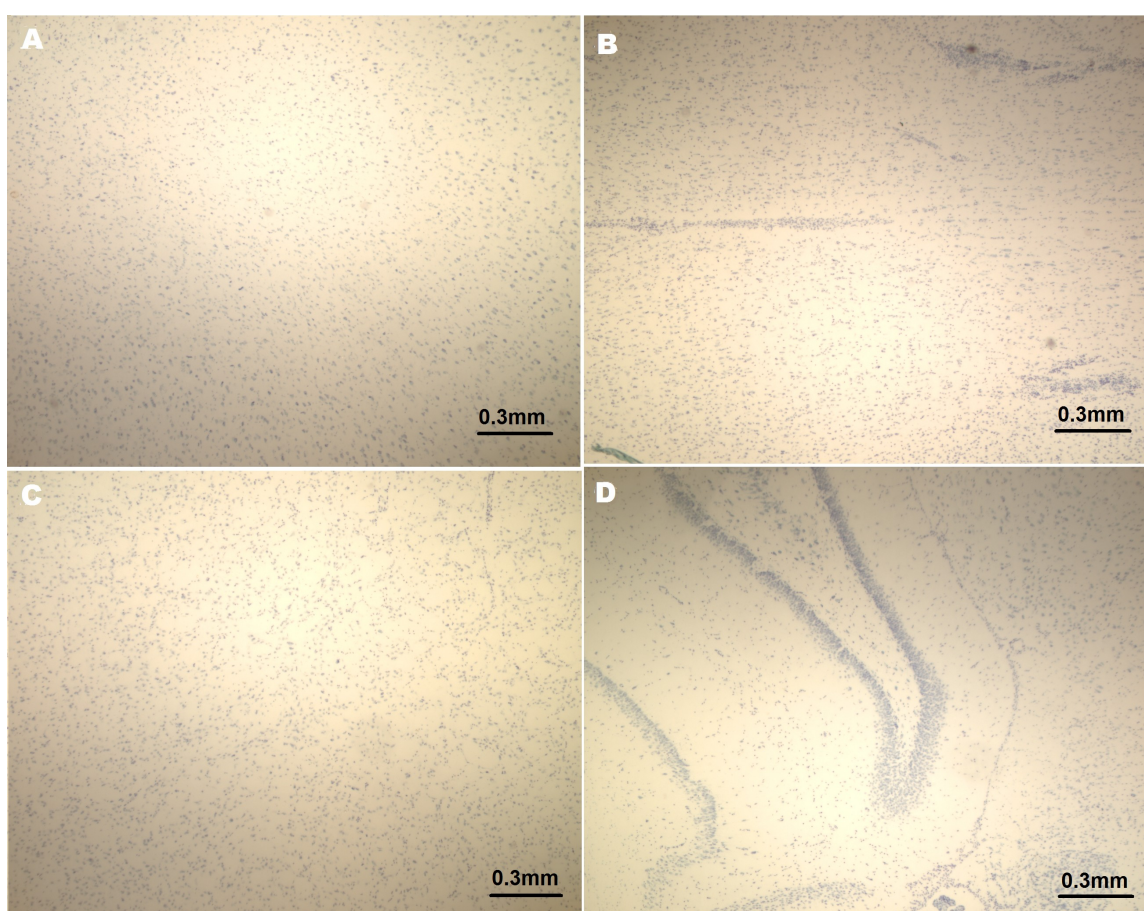


Figura 8. Imágenes de tejido nervioso de ratas tratadas crónica- y subcrónicamente con etanol o agua. Después del tratamiento de los animales, se extrajeron los cerebros y posteriormente se obtuvieron cortes coronales de 20 μm de grosor en un criostato. El tejido se tiñó con violeta de cresilo. A) corteza frontal de un cerebro con tratamiento crónico *ad libitum*; B) tálamo mediodorsal de un cerebro con tratamiento crónico de etanol, C) región del estriado de un cerebro con tratamiento del vehículo, D) hipocampo de un cerebro con tratamiento subcrónico de etanol. Las imágenes se capturaron a un aumento de 100x.

8.2. Evaluación del daño inducido por la exposición crónica de alcohol en el cerebro de la rata

La cantidad de células positivas a Fluoro-Jade B identificadas en este estudio sugieren que el etanol no produjo daño evidente en ninguna de las áreas cerebrales examinadas, ni en ratas tratadas crónicamente ni en animales privados de la droga después del tratamiento.

En las tablas 1, 2 y 3 se especifican las regiones en las que se identificaron células fluorescentes, la cantidad de éstas y la extensión de las regiones observadas, seguidos por la relación de células fluorescentes por mm² y el porcentaje de células fluorescentes con respecto a la población celular de la región. Los resultados se muestran desglosados en tres grupos de acuerdo al tiempo transcurrido después del último día de exposición a alcohol (0, 24 y 48 h). En cada tabla se muestran los resultados de los cerebros de cuatro animales tratados (etanol) y de cuatro animales control (*ad libitum*). La tabla 1 corresponde al grupo de 0 h de privación, es decir, de exposición crónica a alcohol por 30 días. En este grupo se encontraron 4 neuronas positivas a Fluoro-Jade B en tres de los cerebros tratados con alcohol y una neurona positiva a Fluoro-Jade B en uno de los cerebros control. Las regiones en las que se encontraron dichas neuronas fueron la corteza insular granular para el grupo control, y la corteza piriforme, el caudado-putamen y el núcleo paraventricular del tálamo para el grupo de etanol. La tabla 2 contiene los datos del grupo de 24 h de privación posterior al tratamiento crónico. En el grupo control se encontró una neurona en el núcleo talámico mediodorsal de uno de los cerebros, mientras que en dos de los cerebros del grupo de etanol se encontraron neuronas marcadas con Fluoro-Jade B. Las regiones en las que se localizaron fueron el caudado-putamen y la región CA1 del hipocampo. En la tabla 3, que corresponde al grupo de 48 h de privación de la droga, se muestra que hubo dos cerebros del grupo control con neuronas positivas a Fluoro-Jade B en la corteza somatosensorial primaria y en el núcleo dorsal del raphe, mientras que en los animales tratados con etanol se encontró una neurona fluorescente en la corteza frontal de asociación de un cerebro.

El conjunto de estos datos indica que dentro de ningún grupo se repite una misma región con células positivas a Fluoro-Jade B. La falta de consistencia en las regiones identificadas con células fluorescentes sugiere que ninguna de las zonas en las que hubo células positivas a Fluoro-Jade B es representativa del grupo en el que se encontró. Por ello, no es posible comparar las regiones con células fluorescentes entre los diferentes grupos.

Tabla1. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas expuestas crónicamente a alcohol por 30 días

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ
1	Corteza insular granular (hemisferio izquierdo)	100	1	0.01	0.013%	1	Corteza piriforme (hemisferio derecho)	41.7	1	0.023	0.03%
2	-	-	-	-		2	Caudado-putamen (CPu) dorsal (hemisferio derecho)	131.33	2	0.015	0.019%
3	-	-	-	-		3	Núcleo paraventricular del tálamo	7.14	1	0.14	0.18%
4	-	-	-	-		4	-	-	-	-	

Del lado izquierdo se muestran los resultados obtenidos en las ratas que recibieron agua para beber durante los 30 días de tratamiento, mientras que del lado derecho se muestran los resultados obtenidos en las ratas sometidas al tratamiento con etanol 10% como única opción para beber. Estos grupos se sacrificaron inmediatamente después del 30º día de tratamiento.

Tabla 2. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas expuestas crónicamente a alcohol por 30 días y privadas de la droga por 24 h

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ
1	-	-	-	-		1	-	-	-	-	
2	-	-	-	-		2	CPu dorsal (hemisferio izquierdo)	310.4	1	0.003	0.004%
3	Núcleo talámico mediodorsal (hemisferio izquierdo)	126.1	1	0.007	0.01%	3	CA1 hipocampo (hemisferio derecho)	193.5	1	0.005	0.005%
4	-	-	-	-		4	-	-	-	-	

Del lado izquierdo se muestran los resultados obtenidos en las ratas que recibieron agua para beber durante 31 días de tratamiento. Del lado derecho se muestran los resultados obtenidos en las ratas sometidas durante 30 días al tratamiento con etanol 10% como única opción para beber, tras lo cual se mantuvieron un día con agua en lugar de etanol. Estos grupos se sacrificaron inmediatamente después del 31° día.

Tabla 3. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas expuestas crónicamente a alcohol por 30 días y privadas de la droga por 48 h.

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ
1	Corteza somatosensorial primaria (hemisferio derecho)	424.63	1	0.002	0.002%	1	Corteza frontal de asociación (hemisferio izquierdo)	56.9	1	0.017	0.02%
2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
3	Núcleo rostral del raphe (hemisferio derecho)	2.56	1	0.39	0.43%	3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-

Del lado izquierdo se muestran los resultados obtenidos en las ratas que recibieron agua para beber durante 32 días de tratamiento. Del lado derecho se muestran los resultados obtenidos en las ratas sometidas durante 30 días al tratamiento con etanol 10% como única opción para beber, tras lo cual se mantuvieron dos días con agua en lugar de etanol. Estos grupos se sacrificaron inmediatamente después del 32° día.

En la Figura 9 se presentan algunas imágenes de células fluorescentes identificadas en diferentes regiones de los cerebros de animales tratados crónicamente con agua o con alcohol.

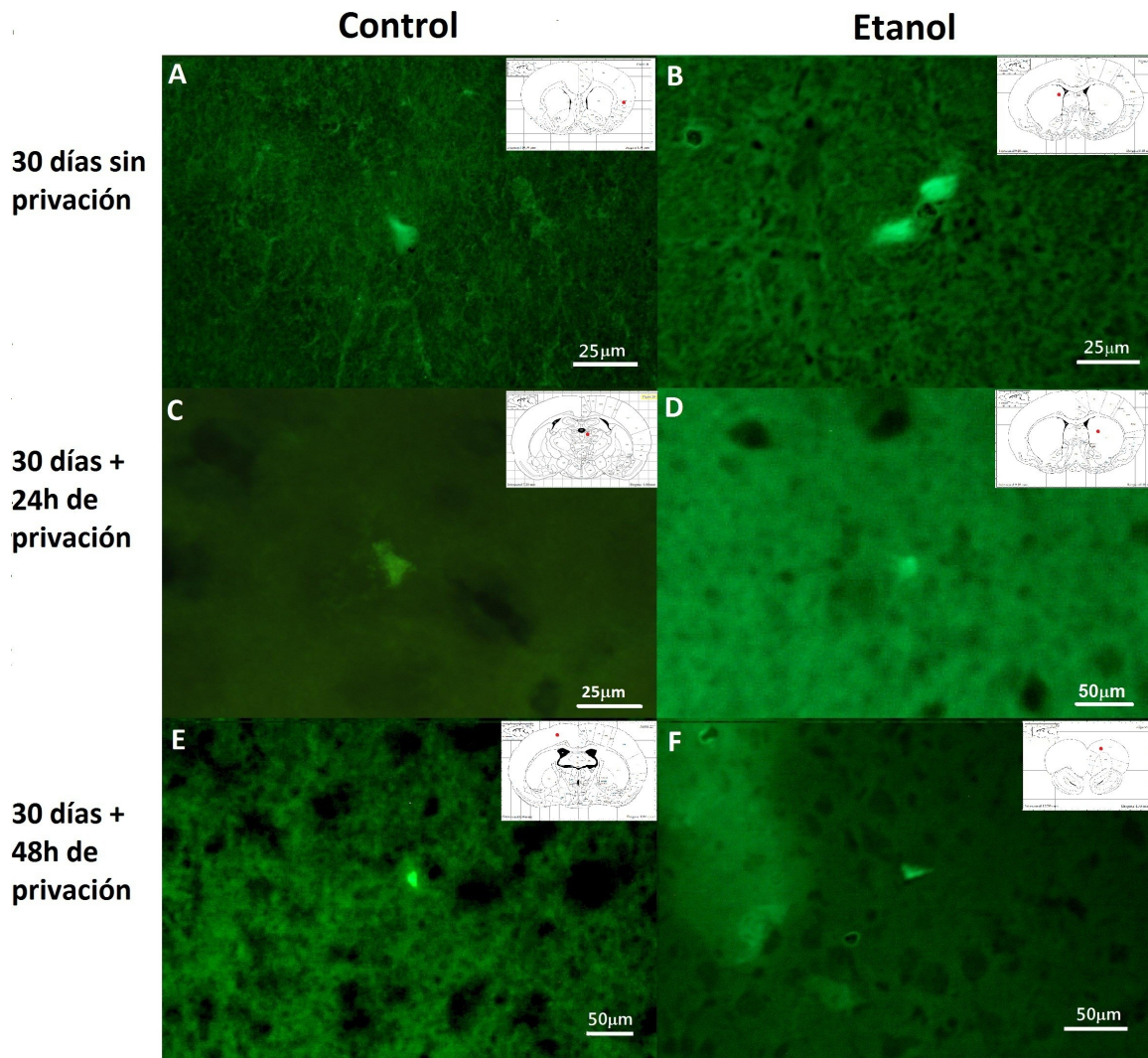


Figura 9. Células positivas a Fluoro-Jade B en regiones cerebrales de animales control (izquierda) o tratados crónicamente con etanol (derecha) y privados de la droga. A) Corteza insular granular, tratamiento *ad libitum* sin privación; B) CPu dorsal, tratamiento etanol sin privación; C) Núcleo talámico mediodorsal, tratamiento *ad libitum* con 24 h de privación; D) CPu dorsal, tratamiento etanol con 24 h de privación; E) Corteza somatosensorial primaria, tratamiento *ad libitum* con 48 h de privación; F) Corteza frontal de asociación, tratamiento etanol con 48 h de privación. En cada recuadro se muestra un esquema, tomado del atlas de Paxinos y Watson (2005) del nivel de corte al que corresponde la imagen y con un punto rojo se señala el lugar específico en el que se encontró la célula fluorescente que se presenta. Las imágenes se capturaron a un aumento de 400x.

De los 24 cerebros examinados para el tratamiento crónico, hubo 8 con tratamiento *ad libitum* y 6 con tratamiento de etanol en los que no se encontró ninguna célula fluorescente; lo que redujo significativamente el tamaño de la muestra de cada grupo. El único grupo que

tuvo tres cerebros (de los cuatro examinados) con al menos una célula positiva a Fluoro-Jade B fue el grupo de etanol sin privación. En los grupos control sin privación, control con privación de 24h y etanol con privación de 48h, solo hubo un cerebro (de los cuatro examinados) en cada grupo con una célula fluorescente. A causa de esto, y debido a que no se encontraron células fluorescentes en las mismas áreas en los grupos control y tratados con etanol, los datos no pudieron someterse a análisis estadístico.

8.3. Niveles plasmáticos de alcohol en ratas expuestas crónicamente a etanol por 30 días

En la Figura 10 se muestran las concentraciones de alcohol que se determinaron en la sangre obtenida inmediatamente después de los 30 días de tratamiento (sin privación) y tras 24 y 48 h después del 30° día de tratamiento (con privación de 24 h y 48 h, respectivamente). Los niveles de alcohol en sangre en los animales tratados crónicamente con etanol por 30 días fueron muy similares a los de las ratas con el mismo tratamiento y privados de la droga por 24 h (Figura 10). Los valores promedio alcanzados fueron de 4.2 y 4.4mg/dl, respectivamente. En contraste, los niveles de alcohol detectados en los animales tratados crónicamente con etanol y privados de la droga por 48 h fueron mucho menores (valor promedio de 2.67 mg/dl).

Con estos datos se puede ver que los animales que recibieron etanol durante 30 días mantuvieron niveles constantes de alcohol en sangre significativamente mayores que los animales control hasta las 24h después del último día de ingesta de la droga. A las 48h de privación del etanol, los niveles de alcohol en sangre disminuyen aproximadamente a la mitad, a pesar de esto las CAS de este grupo son significativamente más altas que las de los controles.

8.4. Evaluación del daño inducido por la exposición subcrónica de alcohol (“binge”) en el cerebro de la rata

Las ratas en este tratamiento recibieron una administración de etanol o agua, según el caso, cada 8 h durante 4 días, de manera que la cantidad total de inyecciones intraperitoneales fue de 12. Al término del tratamiento, los animales se sacrificaron a diferentes tiempos (1, 4, 8 y 24 h) después de la última administración intraperitoneal.

Para realizar los estudios histológicos en este grupo de animales se procedió de igual manera que en el experimento crónico de 30 días. Se examinaron los cerebros de los animales en busca de daño, se calculó el área observada bajo el microscopio de las regiones en las que se identificaron células fluorescentes y se calculó la población total de células en dichas regiones. Con estos datos se realizó un reporte del número de células positivas a Fluoro-Jade B encontradas por área (mm²) y otro reporte expresado como porcentaje de células fluorescentes por población celular de la región.

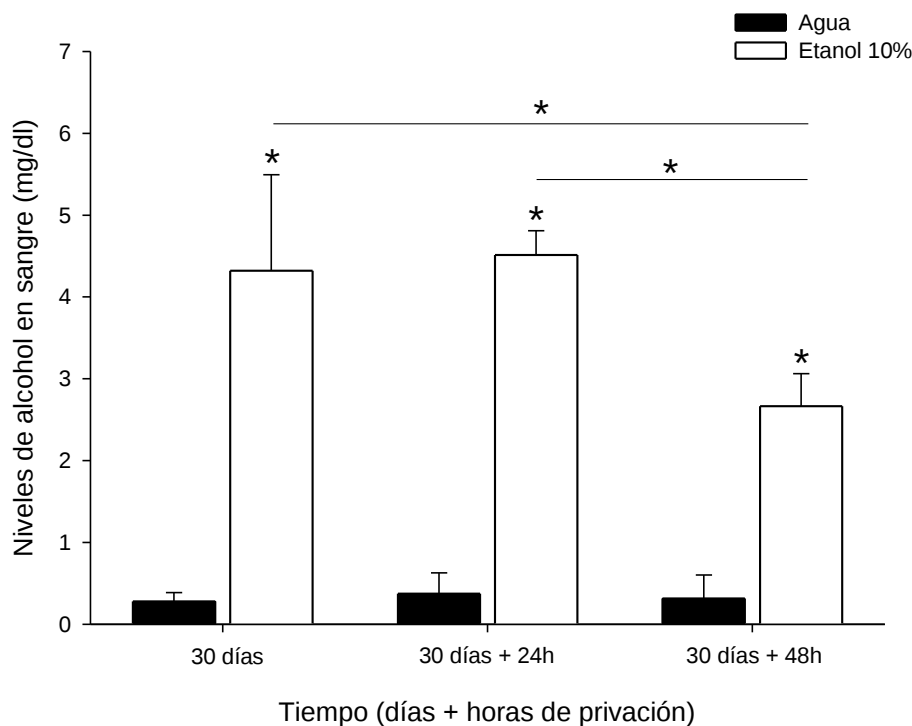


Figura 10. Niveles de alcohol en sangre en ratas con tratamiento crónico con la droga. Ratas Wistar macho se trataron crónicamente con etanol 10% o con agua como bebida (*ad libitum*) por 4 semanas. Los animales se sacrificaron 0, 24 o 48h después del tratamiento y se obtuvo la sangre troncal. Los niveles de alcohol en sangre se determinaron en el plasma por el método de la ADH. Los valores se expresan como el promedio \pm EEM de 4 animales en cada grupo. * $p < 0.001$ versus agua en los mismos tiempos. Se detectaron también diferencias significativas en las CAS de los animales crónicos y crónicos con privación por 24 h versus los animales crónicos con privación por 48 h (* $p < 0.001$).

Las regiones cerebrales en las que se encontraron células positivas a Fluoro-Jade B se muestran en las tablas 4-7, al igual que la extensión de éstas y la cantidad de células fluorescentes identificadas, se indica también la relación de células fluorescentes por mm^2 y el porcentaje de células fluorescentes con respecto a la población celular de la región. En los cerebros de los animales sacrificados 1h después de la última inyección (Tabla 4) se identificó únicamente una célula positiva a Fluoro-Jade B en el grupo de etanol localizada en la corteza orbitofrontal; en los cerebros de animales control no se identificó ninguna célula fluorescente. En el grupo control de los animales sacrificados 4h después de la última inyección se encontró una célula en la corteza frontal de asociación, mientras que en el grupo de etanol se encontraron dos células positivas a Fluoro-Jade B, una localizada en la corteza piriforme y la otra en la región CA1 del hipocampo (Tabla 5). En la Tabla 6 se muestran los resultados de los grupos sacrificados 8 h después de la última inyección del tratamiento. En los cerebros de los animales control se identificó una célula fluorescente en el núcleo geniculado y otra en el núcleo lateral septal, mientras que en el grupo de etanol

hubo una neurona positiva a Fluoro-Jade B en la substantia nigra y otra en la región del estriado. Finalmente, la Tabla 7 muestra que se identificó una célula positiva a Fluoro-Jade B en la corteza visual primaria de un cerebro control, mientras que en los cerebros tratados con etanol se encontraron dos células fluorescentes, una en la corteza del núcleo accumbens y otra en la corteza motora secundaria. Estos resultados no reflejan ninguna región cerebral que se encuentre repetida dentro de los grupos e indican que las áreas con células positivas a Fluoro-Jade B no son representativas del grupo en el que se identificaron. Por lo tanto, no fue posible hacer un análisis comparativo entre dichas regiones. Como en el caso del tratamiento crónico, la administración tipo “binge” utilizada en este estudio tampoco indujo daño celular que pudiera ser evidenciado con Fluoro-Jade B.

Tabla 4. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas tratadas subcrónicamente con alcohol y sacrificadas 1 h después de la última administración

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Región con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ
1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	2	Corteza orbitofrontal (hemisferio izquierdo)	60.3	1	0.016	0.02%
3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-

Del lado izquierdo se muestran los datos de las neuronas positivas a Fluoro-Jade B encontradas en los cerebros de ratas inyectadas con agua y del lado derecho los de los animales tratados con etanol (3 g/kg). En los cerebros que pertenecen a los animales que recibieron agua no se encontró ninguna región con células fluorescentes.

Tabla 5. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas tratadas subcrónicamente con alcohol y sacrificadas 4 h después de la última administración

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Porcentaje de células positivas a FJ
1	-	-	-	-	-	1	Corteza piriforme (hemisferio derecho)	45.9	1	0.021	0.027%
2	-	-	-	-	-	2	CA1 hipocampo (hemisferio derecho)	188	1	0.005	0.006%
3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
4	Corteza frontal de asociación (hemisferio izquierdo)	55.4	1	0.018	0.022%	4	-	-	-	-	-

Del lado izquierdo se muestran los datos de las neuronas positivas a Fluoro-Jade encontradas en los cerebros de ratas inyectadas con agua y del lado derecho los de los animales tratados con etanol (3 g/kg).

Tabla 6. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas tratadas subcrónicamente con alcohol y sacrificadas 8 h después de la última administración

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ
1	-	-	-	-		1	Substantia nigra (hemisferio izquierdo)	24.3	1	0.041	0.053%
2	-	-	-	-		2	-	-	-	-	
3	Núcleo geniculado (hemisferio derecho)	29.3	1	0.034	0.042%	3	-	-	-	-	
4	Núcleo lateral septal (hemisferio izquierdo)	45.8	1	0.021	0.028%	4	CPu dorsal (hemisferio izquierdo)	136.5	1	0.007	1/11056

Del lado izquierdo se muestran los datos de las neuronas positivas a Fluoro-Jade encontradas en los cerebros de ratas inyectadas con agua y del lado derecho los de los animales tratados con etanol (3 g/kg).

Tabla 7. Regiones cerebrales con células positivas a Fluoro-Jade B en ratas tratadas subcrónicamente con alcohol y sacrificadas 24 h después de la última administración

Control						Etanol					
Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ²	Por ciento de células positivas a FJ	Número de ejemplar	Área con células positivas a FJ	Área examinada (mm ²)	Cantidad de células positivas a FJ encontradas	Número de células positivas a FJ por mm ³	Por ciento de células positivas a FJ
1	-	-	-	-	-	1	Corteza del núcleo accumbens (hemisferio derecho)	5.56	1	0.18	0.19%
2	Corteza visual primaria (hemisferio izquierdo)	25.2	1	0.04	0.046%	2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	4	Corteza motora secundaria (hemisferio izquierdo)	21.1	1	0.047	0.055%

Del lado izquierdo se muestran los datos de las neuronas positivas a Fluoro-Jade encontradas en los cerebros de ratas inyectadas con agua y del lado derecho los de los animales tratados con etanol (3 g/kg).

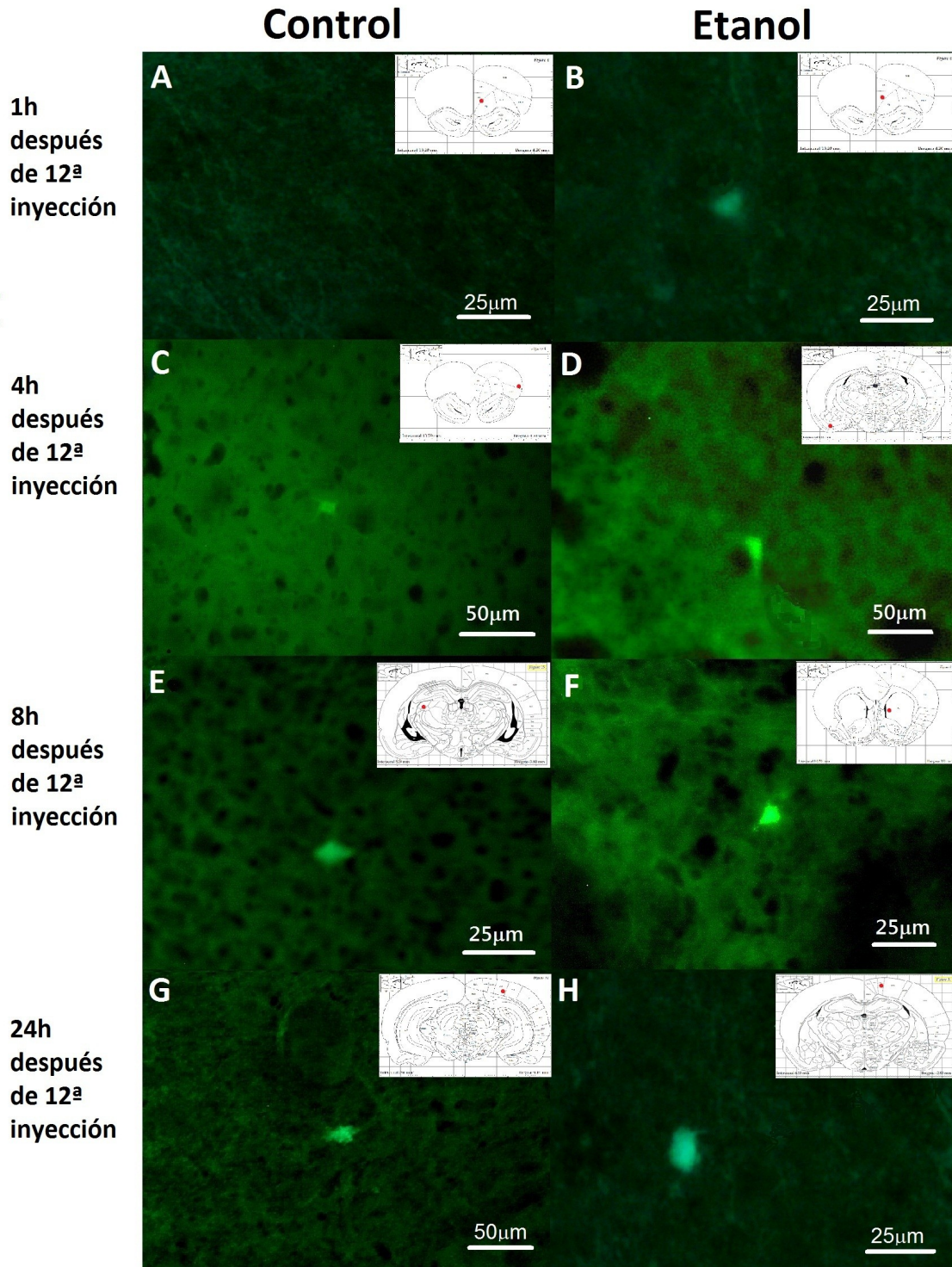


Figura 11. Células positivas a Fluoro-Jade B en distintas regiones del cerebro de animales tratados subcrónicamente con agua o con etanol (3 g/kg). A) Corteza orbitofrontal de cerebro con tratamiento de agua 1h después de la última inyección. En esta imagen no se observan células positivas a Fluoro-Jade B. B) Corteza orbitofrontal de cerebro con tratamiento de etanol 1h después de la última administración de la droga. C) Corteza frontal de asociación de cerebro con tratamiento de agua 4h después de la última administración. D) Corteza piriforme de cerebro con tratamiento con etanol 4h después de la última inyección. E) Núcleo geniculado del tálamo de cerebro con tratamiento de agua 8h después de la última administración. F) CPu de cerebro con tratamiento con etanol 8h después de la última administración. G) Corteza visual primaria de un cerebro con tratamiento de agua 24h después de la última inyección. H) Corteza motora secundaria de un cerebro con tratamiento de etanol 24h después de la última administración de la droga. En cada recuadro se muestra un esquema, tomado del atlas de Paxinos y Watson (2005) del nivel de corte al que corresponde la imagen y con un punto rojo se señala el lugar específico en el que se encontró la célula fluorescente que se presenta. Las imágenes se capturaron a un aumento de 400x.

En la figura 11 se presentan las imágenes capturadas de algunas de las regiones cerebrales en las que se detectaron células positivas a Fluoro-Jade B. Se muestra una imagen representativa de cada tiempo de sacrificio del grupo control y del grupo etanol.

De los 32 cerebros examinados para el tratamiento subcrónico, 12 pertenecientes a los animales que recibieron agua y 9 de los animales que recibieron etanol no presentaron células fluorescentes. De los cerebros que se obtuvieron sacrificando a los animales 1h después de la última inyección los cuatro controles presentaron una ausencia de células positivas a Fluoro-Jade, al igual que tres cerebros del grupo de etanol. En el grupo control sacrificado 4h después de la última administración del tratamiento hubo 3 cerebros sin células fluorescentes, mientras que en el grupo etanol hubo 2. Para el tercer grupo sacrificado 8h después de la última inyección 2 cerebros control y 2 cerebros etanol presentaron cero células positivas a Fluoro-Jade B y en el último grupo de 24h después de la última administración 3 cerebros de tratamiento con agua no presentaron células fluorescentes y 2 con tratamiento etanol tuvieron la misma condición. Dichos resultados redujeron significativamente el tamaño de la muestra de cada grupo, impidiendo realizar un análisis estadístico.

8.5. Niveles plasmáticos de alcohol en ratas tratadas subcrónicamente con etanol por 4 días.

La primera parte del protocolo referente a la determinación de los niveles de etanol en sangre en el tratamiento “binge” consistió en el registro de las CAS de las ratas sacrificadas a diferentes tiempos después de que se administró la última dosis del tratamiento. Los resultados del ANOVA muestran los efectos en las CAS del tipo de tratamiento (etanol o agua) versus el tiempo de sacrificio (1h, 4h, 8h y 24h) y muestra los efectos en las CAS de los tratamientos (etanol versus agua) a un mismo tiempo de sacrificio.

Con este análisis se puede observar que 1h después de finalizado el tratamiento subcrónico con etanol (3g/kg), las CAS alcanzaron niveles promedio de 160mg/dl, los cuales se mantuvieron elevados (con un promedio de 142mg/dl) 4 h después de terminado el tratamiento. Posteriormente, se observó una disminución gradual en las CAS conforme aumenta el tiempo después de administrada la última dosis de alcohol, a un tiempo de 8h se observan valores de 66mg/dl mientras que transcurridas 24 h el valor promedio de los niveles de alcohol en sangre se encuentra alrededor de los 22 mg/dl (Figura 12).

Con el protocolo subcrónico los animales alcanzaron CAS mucho mayores que las registradas en el protocolo crónico y en repetidas ocasiones durante el tratamiento “binge” (probablemente después de cada inyección intraperitoneal de etanol) las CAS estaban dentro del rango considerado intoxicante (Faingold, 2008).

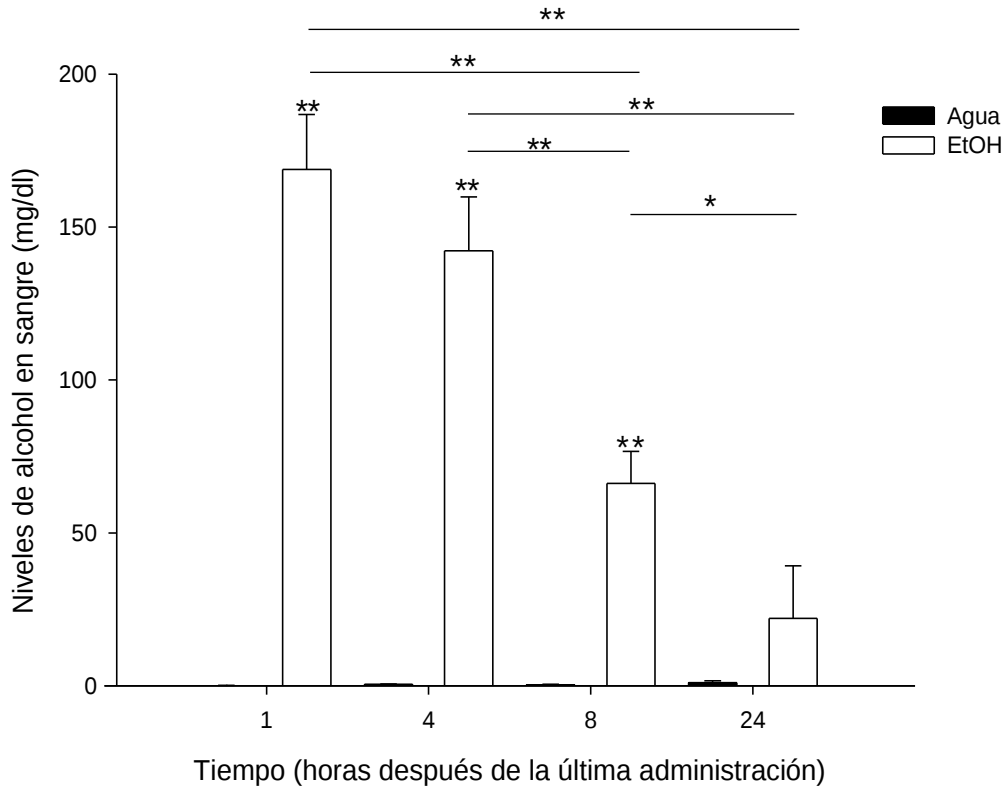


Figura 12. Curso temporal de los niveles de alcohol en sangre en ratas tratadas subcrónicamente con etanol o agua por 4 días. Los animales recibieron etanol (3 g/kg) o agua (tres veces al día, cada 8 h) por 4 días y fueron sacrificados 1, 4, 8 o 24h después de la duodécima inyección. Las CAS se determinaron por el método espectrofotométrico de la ADH. Cada barra representa el promedio \pm EEM de 4 animales. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ al comparar el tipo de tratamiento (etanol o agua) entre sí y entre los 4 días.

En la segunda parte de la determinación de CAS en el protocolo subcrónico se realizaron mediciones de los niveles de etanol en sangre en diferentes momentos del tratamiento para registrar los cambios en las CAS que podrían generarse en las ocho horas que separaban una inyección de otra y averiguar si los niveles de etanol se mantenían elevados o disminuían en estos periodos. Los resultados del ANOVA muestran los efectos en las CAS entre las condiciones antes y después de la inyección dentro de un mismo día y muestran el efecto en las CAS de los 4 días de tratamiento versus el momento relativo a la inyección (1h antes o 1h después de la inyección). En la Figura 13 se muestran los niveles de alcohol en sangre registrados en cada día del tratamiento una hora antes y una hora después de la inyección aplicada a las 15:30h. Se puede observar que una hora antes de la aplicación de la tercera inyección (15:30 h del primer día de tratamiento) de etanol (3 g/kg) las CAS permanecen elevadas (valor promedio de 148 mg/dl), a pesar de que habían transcurrido 7 h desde la administración de la segunda dosis de etanol. Una hora después de la tercera administración de etanol, las CAS se elevan, alcanzando un valor promedio de 203 mg/dl. En contraste con las CAS determinadas 1 h antes de la tercera administración de etanol, las CAS de las muestras tomadas 1 h antes de las inyecciones 6, 9 y 12 se encuentran significativamente reducidas (valores promedio de 25, 23 y 26 mg/dl, respectivamente), lo que sugiere una adaptación metabólica como respuesta a la exposición continua de etanol. Las CAS de las muestras tomadas 1 h después de las administraciones 6, 9 y 12 se elevan significativamente con respecto a los niveles registrados 1h antes. Sin

embargo, las CAS correspondientes a 1 h después de la novena y duodécima administración de etanol (valores promedio de 128 y 146 mg/dl respectivamente) son significativamente menores a las CAS que se alcanzaron 1 h después de la tercera y sexta dosis de alcohol, fenómeno que sugiere nuevamente una adaptación metabólica.

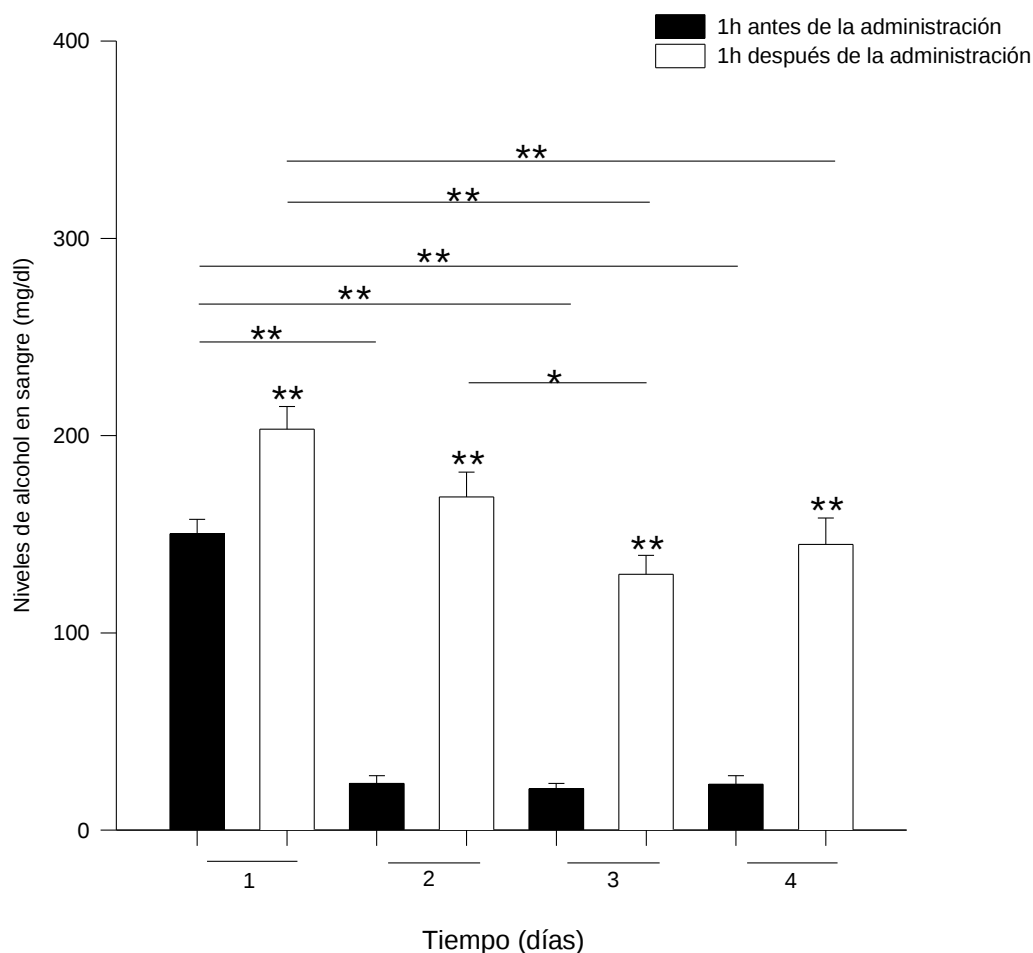


Figura 13. Niveles de alcohol en sangre en ratas tratadas subcrónicamente con etanol por cuatro días. Se muestran los niveles de alcohol en plasma de muestras de sangre tomadas 1 h antes y 1 h después de las inyecciones administradas a las 15:30h del día 1 (tercera inyección), 2 (sexta inyección), 3 (novena inyección) y 4 (duodécima inyección) del tratamiento subcrónico (4 días). Los niveles de alcohol en sangre se determinaron mediante el ensayo de la ADH. Cada barra representa el promedio \pm EEM de 5 animales. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ al comparar las CAS 1h antes y 1h después durante los 4 días.

En los 4 días, las CAS registradas 1h después de la administración de etanol muestran niveles promedio de 203-128mg/dl, que son concentraciones intoxicantes (Faingold, 2008). A partir del segundo día de tratamiento, las CAS registradas 7 h después de la última administración de etanol se encuentran alrededor de los 25 mg/dl, la cual es una concentración considerada no intoxicante (Faingold, 2008). Durante los días 2, 3 y 4, la diferencia existente entre las CAS antes de las administraciones de etanol y las CAS después de estas administraciones es significativa y se encuentra en un rango de 106 a 148mg/dl (88-63%), lo cual demuestra que las CAS a lo largo del tratamiento no fueron constantes. Estas fluctuaciones pueden relacionarse con un tipo de consumo en humanos

en el que se ingieren grandes cantidades de etanol en pocas horas tras lo cual se descansa (e.g. una noche) y se vuelve a repetir el acto.

9. Discusión

El alcohol es una sustancia que tiene una amplia gama de efectos y son muchos los tejidos que se ven afectados por sus acciones. Los daños a la salud que son propiciados u ocasionados por el abuso en la ingesta de etanol son muy variados. Entre los órganos y sistemas que se ven más comprometidos se encuentran el hígado, los riñones, el sistema gastrointestinal y el sistema nervioso. (Brust, 2010; Fadda y Rossetti, 1998; Medina-Mora *et al.*, 2002; U.S. Department of Health and Human Services, 2000).

Los daños ocasionados por el etanol dependen de varios factores, entre los que se encuentran la cantidad de alcohol ingerida, la duración de los periodos en los que se mantiene el estado de intoxicación, el número de eventos de abstinencia y la duración de éstos y la ingesta de otras sustancias psicoactivas a la par del etanol. Además, también tienen una influencia importante factores como la predisposición genética a la sensibilidad y vulnerabilidad a la droga, el estado nutricional, el género y la edad de la persona (Crews *et al.*, 2000; Fadda y Rossetti, 1998; Koob, 1999). La medida en la que la salud de un individuo se vea afectada por el abuso de alcohol depende directamente de los factores previamente mencionados, de manera que la magnitud de los daños y la irreversibilidad de éstos está sujeta a la condición del individuo y a su historial con la droga.

Las alteraciones producidas por el etanol en el SNC pueden conducir a una disminución o pérdida de funciones cognitivas o motoras, lo que compromete la vida del organismo. Algunos estudios en humanos y en modelos animales han mostrado que exposiciones cortas a dosis altas de etanol pueden producir lesiones moderadas en regiones cerebrales específicas, pero también se ha reportado la desaparición del daño tras un periodo corto (de 3 a 7 días) de privación de la droga (Collins *et al.*, 1996; Crews *et al.*, 2004; Switzer III, 2000; Zahr *et al.*, 2009). En contraste, la exposición crónica a dosis intoxicantes de etanol afecta a la mayoría de las estructuras cerebrales y, a pesar de que existe una recuperación del daño y de las funciones perdidas si se suspende el uso de la droga, la reparación no es total (Fadda y Rossetti, 1998; Pfefferbaum *et al.*, 1995; Sullivan y Pfefferbaum, 2005).

Considerando los trabajos citados previamente y los resultados que en éstos se reportan, se decidió plantear en el presente proyecto dos modelos de exposición al alcohol (crónico y subcrónico). En ambos modelos se evaluó con Fluoro-Jade B la cantidad de neuronas en degeneración que había al término del tratamiento y a distintos tiempos de privación a la droga.

En las muestras de tejido que integraban cada grupo del tratamiento crónico o subcrónico no se observó un número consistente de neuronas positivas a Fluoro-Jade B que pudiera ser evaluado como significativamente mayor que ninguna neurona en degeneración. La ausencia de una cantidad significativa de células fluorescentes en los cerebros de los animales tratados con etanol puede ser explicada de dos maneras. La primera es que los protocolos de administración de etanol utilizados en este estudio no producen daño en el SNC. La segunda es que las células que hayan sufrido algún daño a

causa del alcohol hayan concluido el proceso de muerte antes del momento en el que se obtuvieron las muestras de tejido, ya que el Fluoro-Jade B solo marca las neuronas que se encuentran en proceso de degeneración.

Para analizar la segunda explicación a la ausencia de células fluorescentes, es preciso conocer la duración de los procesos de muerte neuronal para contar con una aproximación del tiempo que debió haber transcurrido para que las posibles células que iniciaron con el proceso de degeneración hubieran podido concluirlo antes de la toma de muestras del tejido. Los dos tipos de muerte que predominan en el daño inducido por alcohol son la apoptosis y la necrosis (Dikranian *et al.*, 2001; Obernier *et al.*, 2002). La apoptosis es un proceso dinámico de duración variable; el tiempo que tarda en completarse depende del tipo de célula, la naturaleza del agente que la induce y de los parámetros que se midan. Existen estudios *in vivo* en los que se ha reportado que el proceso apoptótico puede durar 1 h en células nerviosas de la retina expuestas a estaurosporina (Cordeiro *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2005). Estudios *in vitro* han mostrado también que el proceso apoptótico inducido por TNF α en células fibroblásticas murinas dura de 3 a 6 h (Okamoto *et al.*, 2002), mientras que cuando es inducido por cromato de potasio en células de laringe humanas dura 24 h (Rudolf *et al.*, 2000). Desafortunadamente, no existen estudios en los que se haya evaluado la duración del proceso apoptótico inducido por etanol. El tiempo necesario para que se concluya el proceso necrótico también depende del tipo de célula en el que se genere, del estímulo que lo provoque y de los parámetros establecidos para detectar los cambios. Por lo tanto, también existe un rango muy variable para la duración del proceso, con la diferencia de que la necrosis puede concretarse en tiempos más cortos que la apoptosis (Lipton, 1999). De igual manera, debe tenerse en consideración que las células que sufren alteraciones que las conducen a la muerte en presencia de etanol no están coordinadas temporalmente; el proceso de degeneración se activa en tiempos distintos dependiendo de la susceptibilidad de las células.

Si se considera el intervalo de 1-24h como el tiempo que podría durar el proceso de muerte celular (apoptótica o necrótica), en las muestras de tejido obtenidas a la finalización del tratamiento crónico teñidas con Fluoro-Jade B no se contaría con la información sobre las alteraciones celulares que pudieron haber ocurrido durante la mayor parte del tratamiento (probablemente hasta el día 29). En los tejidos obtenidos al finalizar el tratamiento subcrónico, también hay una falta de información de los primeros días (aproximadamente hasta el día 3). Sin embargo, en el tejido obtenido tras 24h y 48h de abstinencia de la exposición crónica al alcohol, el tiempo que transcurrió entre un sacrificio y otro no excede las 24h, resulta prácticamente imposible que la totalidad de células que pudieron haber sufrido daño hayan simultáneamente terminado el proceso de muerte antes del momento del sacrificio del animal. En el tratamiento subcrónico, las muestras de tejido obtenidas después de finalizada la exposición a etanol no excedieron las 16h entre una muestra y otra, por lo tanto se llega a la misma conclusión que en el caso del tratamiento crónico. Esto deja abierta la posibilidad de que el daño ocasionado por la exposición crónica o subcrónica a etanol haya ocurrido únicamente durante las etapas tempranas o intermedias del tratamiento y que al término del mismo, la tasa de degeneración haya disminuido considerablemente.

En los diversos reportes de estudios realizados *in vivo* o *in vitro* que inducen degeneración celular en el SNC por medio del etanol, no existe evidencia que muestre que dicho daño ocurra únicamente durante etapas tempranas e intermedias del periodo

de exposición a la droga y que en etapas tardías se detengan los procesos de muerte. Por el contrario, existen reportes de estudios *in vivo* que muestran un incremento en la cantidad de neuronas degeneradas a causa del alcohol en etapas tardías de la exposición a esta sustancia (Cippitelli *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 1998; Obernier *et al.*, 2002). Tampoco se conoce una causa biológica que pudiera explicar de manera clara la repentina finalización de la degeneración celular conforme aumenta en el tratamiento el tiempo de exposición al alcohol sin que disminuya la cantidad de etanol administrada. Debido a la falta de evidencia que sugiera que la degeneración celular que ocurre en cierto periodo de exposición a etanol pueda concluir en las etapas tardías del tratamiento, no es posible utilizar este fenómeno para explicar la escasez de células fluorescentes en el presente trabajo.

Es posible que la ausencia de células positivas a Fluoro-Jade B en los cerebros de los animales tratados con etanol en los dos tipos de protocolos (crónico y subcrónico) desarrollados en este proyecto, se deba a que los niveles de alcohol en sangre producidos por las dosis de etanol administradas no hayan alcanzado concentraciones capaces de inducir daño (Collins *et al.*, 1998; Nixon y Crews, 2002; Obernier *et al.*, 2002), o que las CAS no se hayan mantenido elevadas el tiempo necesario para producir degeneración neuronal.

En el modelo de alcoholismo crónico desarrollado en este proyecto, los animales tuvieron como única opción la solución de etanol 10% (v/v). En estudios previos realizados en el laboratorio, observamos que durante la primera semana del tratamiento las ratas consumieron bajas cantidades de alcohol, lo que se debe a la aversión natural de los animales a la sustancia. Sin embargo, a partir de la segunda semana la ingesta de la sustancia aumentó progresivamente, de manera que en el último día del tratamiento el consumo de alcohol fue de 68 ± 7.8 ml de etanol al 10%, que es equivalente a 5.4g de la sustancia, lo que sugiere el desarrollo de tolerancia (Leriche y Méndez, 2010).

A pesar de que el consumo de etanol duró 30 días, las CAS registradas al terminar el tratamiento no alcanzaron valores muy elevados (CAS promedio de 4.4mg/dl). Después de 24 h de abstinencia al etanol, las CAS se mantuvieron en niveles similares a los registrados en los animales sin privación al alcohol, mientras que después de 48 h de abstinencia las CAS tuvieron una disminución significativa. Las CAS detectadas en los tres grupos de animales no son lo suficientemente elevadas como para considerarlas intoxicantes (Faingold, 2008).

Es posible que durante el tratamiento crónico y la abstinencia se hayan producido adaptaciones metabólicas en los animales. En este sentido, algunos estudios han mostrado que la exposición crónica (duración mayor a 24 días) a etanol promueve la inducción del CYP2E1 (Kishimoto *et al.*, 1995; Lieber, 1999; Lieber, 1997; Zakhari, 2007; Zimatkin *et al.*, 2006) conduciendo a un incremento en la tasa de metabolismo del alcohol. La ADH3 también parece contribuir a acelerar el metabolismo del etanol cuando las CAS son elevadas (Haseba y Ohno, 2010). El mantenimiento de los mismos niveles de alcohol en sangre durante 24h después de haber cesado el consumo de la sustancia parecería no ser congruente con un incremento en la tasa metabólica del etanol ocasionada por la sobreactivación del CYP2E1. Sin embargo, se ha visto que la aceleración del metabolismo debida a CYP2E1 es relevante únicamente con CAS altas (90-250mg/dl) (Alderman *et al.*, 1987; Pikkarainen y Lieber, 1980; Salaspuro y Lieber, 1978). Los niveles de etanol en sangre registrados al finalizar el tratamiento crónico se

encontraban muy por debajo del rango en el CYP2E1 acelera el metabolismo significativamente, por lo tanto, una posible explicación a estos resultados es que durante el tratamiento de 30 días ocurrió una adaptación metabólica que condujo progresivamente a una disminución en las CAS, de manera que en el día 30 del tratamiento los niveles de etanol en sangre habían alcanzado concentraciones a las que el CYP2E1 ya no era un factor que contribuyera de forma importante en el metabolismo del alcohol. Por esta razón las bajas CAS registradas en el estudio no mostraron una disminución significativa durante 24h; dado que en este protocolo de exposición crónica no fue posible monitorear las CAS a lo largo del tratamiento, sería necesario realizar estudios complementarios que ayudasen a determinar si estos cambios metabólicos realmente ocurrieron en los animales.

En el segundo modelo desarrollado en este proyecto se intentó reflejar un tipo de consumo muy común en la población mexicana, que consiste en la ingesta de cantidades altas de alcohol en periodos cortos de tiempo. Las ratas no podrían tomar por sí solas cantidades tan grandes de etanol, por lo que el tipo de administración debió realizarse por medio de inyecciones intraperitoneales. La principal diferencia que este modo de administración tiene con un tipo de consumo oral es que la absorción del etanol ingerido por ésta vía es más lenta que la absorción de la sustancia administrada directamente en la cavidad intraperitoneal, lo que provoca que los picos de las CAS se alcancen en un tiempo mucho menor y sean más altos cuando la administración es intraperitoneal (Ammon *et al.*, 1996; Aragón *et al.*, 2002). El tiempo necesario para alcanzar la CAS más elevada cuando el consumo de alcohol es oral es de 30 min, mientras que sólo se necesitan 10 min para alcanzar el pico máximo en las CAS después de una administración intraperitoneal (Levitt y Levitt, 1998). A pesar de esto, este modelo es una buena aproximación para simular el consumo de alcohol tipo “binge” que tienen los humanos.

En el modelo “binge” utilizado en el presente trabajo se pudieron monitorear las CAS en diferentes momentos del tratamiento. Los resultados obtenidos indican que los niveles de etanol en sangre una hora antes de la inyección de la siguiente dosis, es decir, siete horas después de la última administración, tenían valores significativamente más bajos que los niveles medidos una hora después de la inyección de etanol. De manera interesante, las CAS una hora antes de la última inyección del primer día son bastante más elevadas que las CAS una hora antes de la inyección de los días segundo, tercero y cuarto día. Esto podría ser el reflejo de una adaptación metabólica provocada por la inducción de la enzima CYP2E1. Sin embargo, el incremento en la producción de esta enzima o la disminución en su tasa de degradación solo se ha reportado tras un consumo crónico de etanol (Kishimoto *et al.*, 1995; Lieber, 1997; Zakhari, 2007; Zimatkin *et al.*, 2006). Queda por determinar si ocurre una adaptación metabólica tras un solo día de exposición a la droga. Por otra parte, el cambio en las CAS podría deberse a otros factores, como la cantidad de alimento ingerido; sería posible que durante el primer día el alcohol provocó una disminución en el apetito de los animales (Kokavec, 2008), y la falta de alimento en el sistema digestivo condujo a un incremento en las CAS.

Las diferencias que existen entre los protocolos “binge” utilizados en los estudios en los que se reporta daño después de 4 días de tratamiento (Crews *et al.*, 2000; Obernier *et al.*, 2002; Cippitelli *et al.*, 2009) y el protocolo “binge” utilizado en el presente proyecto es la vía de administración de etanol, y las dosis administradas de esta manera. En los

reportes citados en el párrafo anterior la administración de etanol es intragástrica mediante una sonda insertada en el estómago de los animales, de manera que el etanol es infundido de manera constante y la sustancia es absorbida gradualmente en el estómago e intestino. La dosis inicial que se suministra a las ratas es de 5 g/kg y las siguientes dosis se calculan para que mantengan las CAS en niveles similares a los alcanzados con la primera dosis. Por lo tanto, durante los 4 días de tratamiento las CAS se mantienen elevadas y relativamente constantes (valores cercanos a 290 mg/dl en Crews *et al.*, 2000; 170-270 mg/dl en Obernier *et al.*, 2002; 290-380 mg/dl en Cippitelli *et al.*, 2009), a diferencia del protocolo “binge” desarrollado en el presente trabajo, en el que las fluctuaciones de las CAS registradas están en un rango de 23-203 mg/dl. Esta diferencia en las variaciones de las CAS pudo haber sido el factor que determinara la presencia de daño en los reportes anteriormente citados y la ausencia de daño observable en el presente proyecto. Es importante notar que los protocolos “binge” de los autores listados previamente se aleja fisiológicamente de un consumo “binge” humano, ya que una persona no mantiene niveles de alcohol elevados durante cuatro días consecutivos; el consumo de alcohol se ve interrumpido, por lo menos, en los periodos de sueño. El protocolo “binge” utilizado en el presente trabajo, es una alternativa en el que se observan fluctuaciones más pronunciadas en las CAS a lo largo del tratamiento, las cuales se acercan más a las variaciones en los niveles de alcohol que se producen en el organismo de un sujeto con consumo “binge”.

En base a los análisis de CAS del protocolo “binge” desarrollado en este proyecto, durante algunas horas después de cada administración intraperitoneal, los niveles de alcohol en sangre se elevaban en rangos reportados como suficientes para causar degeneración (Collins *et al.*, 1998; Nixon y Crews, 2002; Obernier *et al.*, 2002), aunque estos niveles no eran constantes a lo largo de las 8 h que transcurrían entre una inyección y otra. El hecho de que las CAS no hayan estado constantemente elevadas en los animales puede ser una posible causa de la ausencia de degeneración celular.

10. Conclusiones y perspectivas

Con el conjunto de datos obtenidos en este trabajo es posible sugerir que una exposición crónica a etanol al 10% con duración de 30 días por consumo oral en ratas Wistar no ocasiona degeneración celular que sea detectable con Fluoro-Jade B al término del tratamiento. La abstinencia a la droga después de los 30 días de exposición tampoco genera un proceso de degeneración que pueda detectarse 24 o 48 h después del último día de ingesta de alcohol. Un tratamiento subcrónico con etanol con duración de 4 días en el que el tipo de administración fue intraperitoneal con dosis de 3g/kg cada 8 h tampoco desencadena procesos degenerativos que puedan observarse con Fluoro-Jade B 1 h después de la última dosis del tratamiento. Después de 4, 8 o 24 h de la última dosis de etanol tampoco se observa degeneración detectable con Fluoro-Jade B. A pesar de que los niveles de etanol en sangre durante el tratamiento “binge” son significativamente mayores a los del tratamiento crónico, esta diferencia no se ve reflejada en el índice de muerte neuronal detectada con Fluoro-Jade B. Esto indica que el incremento en las CAS durante los cuatro días del tratamiento subcrónico no es suficiente para inducir daño, por lo menos, en los tiempos establecidos para obtener las muestras de tejido.

Para asegurar que los protocolos crónico y subcrónico utilizados en este proyecto no ocasionan degeneración neuronal en ningún periodo de la exposición al etanol o de la privación a esta sustancia se necesitaría realizar pruebas histológicas que permitan detectar células que hayan finalizado con el proceso de muerte para descartar la posibilidad de que las células afectadas por el etanol hayan muerto antes del sacrificio del animal y la obtención del tejido. Algunas pruebas histológicas para detectar muerte celular que podrían ser de utilidad son el yoduro de propidio o la tinción de TUNEL. Si la evaluación de los tejidos con estos marcadores de muerte mostrara células degeneradas, surgiría la necesidad de realizar estudios con cursos temporales para establecer con precisión los momentos en que ocurre el daño.

Si se confirmara que los protocolos de administración de alcohol utilizados en el presente proyecto no inducen daño en el SNC de la rata, resultaría de especial interés estudiar la causa por la que existe una resistencia celular al etanol en estos casos particulares.

11. Referencias

- Albarracín-Cordero AL, Stab II BR, Guillen F, Reyes-Montano EA. (2012) A Molecular Mechanism of Ethanol Dependence: The Influence of the Ionotropic Glutamate Receptor Activated by N-Methyl-D-Aspartate. En: *Addictions - From Pathophysiology to Treatment* (Belin D. editor) InTech, 2012, pp. 169-195
- Alcaro A, Huber R, Panksepp J. (2007) Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: an Affective Neuroethological Perspective. *Brain Res Rev*, 56: 283–321.
- Alderman J, Takagi T, Lieber CS. (1987) Ethanol-metabolizing pathways in deermice. Estimation of flux calculated from isotope effects. *J Biol Chem*, 262: 7497-503.
- Alfonso-Loeches S y Guerri C. (2011) Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 48 :19-47.
- Álvarez-Buylla A, Herrera DG, Wichterle H. (2000) The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res*, 127: 1-11.
- Ammon E, Schäfer C, Hofmann U, Klotz U. (1996) Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans: is it gastric or hepatic and does it depend on gender? *Clin Pharmacol Ther*, 59: 503-13.
- Aragón C, Miguel M, Correa M, Sanchis-Segura C. (2002) Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones* Vol. 14, Supl. 1
- Arendt T, Henning D, Gray JA, Marchbanks R. (1988) Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bul*, 21: 563-9.
- Armstrong RJ y Barker RA. (2001) Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration? *Lancet*, 358: 1174–1176.

- Beauge F, Gallay J, Stibler H, Borg S. (1988) Alcohol abuse increases the lipid structural order in human erythrocyte membranes. A steady-state and time-resolved anisotropy study. *Biochem Pharmacol* 37: 3823–3828.
- Beracochea D, Durkin TP, Jaffard R. (1986) On the involvement of the central cholinergic system in memory deficits induced by long term ethanol consumption in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 24: 519-24.
- Berruecos Villalobos LA. (2005) La investigación sobre el consumo de alcohol entre la población indígena de México. *LiberAddictus*. 85 mayo-junio.
- Bielawski D y Abel E. (2002) The effect of administering ethanol as single vs. divided doses on blood alcohol levels in the rat. *Neurotoxicol Teratol*, 24: 559–562
- Bird MK y Lawrence AJ. (2009) Group I Metabotropic Glutamate Receptors: Involvement in Drug-Seeking and Drug-Induced Plasticity. *Curr Mol Pharmacol*, 2: 83-94
- Björklund A y Dunnett SB. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 30:194-202.
- Blendy JA y Maldonado R. (1998) Genetic analysis of drug addiction: the role of cAMP response element binding protein. *J Mol Med*, 76: 104–110.
- Bondy SC y Orozco J. (1994) Effects of ethanol treatment upon sources of reactive oxygen species in brain and liver. *Alcohol Alcohol*, 29 :375-83.
- Bonthius DJ y West JR. (1990) Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res*, 14: 107-118.
- Bowden SC, Crews FT, Bates ME, Fals-Stewart W, Ambrose ML. (2001) Neurotoxicity and neurocognitive impairments with alcohol and drug-use disorders: potential roles in addiction and recovery. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 317-21.
- Brust JC. (2010) Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review. *Int J Environ Res Public Health*, 7:1540-57.
- Bühler M, Mann K. (2011) Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. *Alcohol Clin Exp Res*, 35:1771-1793
- Caballería J. (2003) Current concepts in alcohol metabolism. *Ann Hepatol*. 2: 60-68.
- Chanraud S, Leroy C, Martelli C, Kostogianni N, Delain F, Aubin HJ, Reynaud M, Martinot JL. (2009) Episodic memory in detoxified alcoholics: contribution of grey matter microstructure alteration. *PLoS One*, 4: e6786.
- Chau P, Stomberg R, Fagerberg A, Söderpalm B, Ericson M. (2010) Glycine receptors involved in acamprosates' modulation of accumbal dopamine levels: an in vivo microdialysis study. *Alcohol Clin Exp Res*, 34 :32-38.

Chemicon (2013) Fluoro-Jade B (degenerating neurons). *EMD Millipore Corporation*, Billerica, MA, EUA.

Chen G, Cuzon Carlson VC, Wang J, Beck A, Heinz A, Ron D, Lovinger DM, Buck KJ. (2011) Striatal involvement in human alcoholism and alcohol consumption, and withdrawal in animal models. *Alcohol Clin Exp Res*, 35 :1739-1748

Chen S, Periasamy A, Yang B, Herman B, Jacobson K, Sulik KK. (2000) Differential sensitivity of mouse neural crest cells to ethanol-induced toxicity. *Alcohol*, 20: 75–81

Cippitelli A, Damadzic R, Frankola K, Goldstein A, Thorsell A, Singley E, Eskay RL, Heilig M. (2010) Alcohol-Induced Neurodegeneration, Suppression of Transforming Growth Factor- β , and Cognitive Impairment in Rats: Prevention by Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Biol Psychiatry*, 67:823–830.

Centro de Información en Salud Mental y Adicciones (CISMAD), Instituto Mexicano de Psiquiatría, México. Estimaciones del consumo *per cápita* en México, 1970-1997

Collins MA, Zou J, Neafsey EJ. (1998) Brain damage due to episodic alcohol exposure *in vivo* and *in vitro*: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *The FASEB Journal*. 12: 221-230.

Collins MA, Corso TD, Neafsey EJ. (1996) Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 284-292.

Collins RL, Gollnisch G, Izzo CV (1996b) Drinking restraint and alcohol related outcomes: exploring the contributions of beverage instructions, beverage content and self-monitoring. *J Stud Alcohol*, 57:563–571.

Cordeiro MF, Guo L, Luong V, Harding G, Wang W, Jones HE, Moss SE, Sillito AM, Fitzke FW. (2004) Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *PNAS*, 101: 13352-13356

Cordeiro MF, Luong V, Maass A, Guo L, Tsaturian V, Fitzke F. W. (2005) Time–Course of Single Cell Apoptosis *in vivo* Using Video and Image Analysis of Retinal Ganglion Cell Disease Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46: 4823-B26.

Cowen MS y Lawrence AJ. (1999) The role of opioid-dopamine interactions in the induction and maintenance of ethanol consumption. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23: 1171-212.

Crews FT. (1999) Alcohol and neurodegeneration. *CNS Drug Reviews*, 5: 379–394.

Crews FT, Braun CJ, Hoplight B, Switzer III RC, Knapp DJ. (2000) Binge Ethanol Consumption Causes Differential Brain Damage in Young Adolescent Rats Compared With Adult Rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 24: 1712-1723.

- Crews FT. (2000b) Neurotoxicity of alcohol: Excitotoxicity, oxidative stress, neurotrophic factors, apoptosis, and cell adhesion molecules. En: *Review of NIAAA's Neuroscience and Behavioral Research Portfolio, Monograph No. 34*, (Noronha M, Eckardt M, Warren K eds), pp 189–206. National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J, Noronha A. (2004) Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 350-64.
- Czachowski CL, Chappell AM, Samson HH. (2001) Effects of raclopride in the nucleus accumbens on ethanol seeking and consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 1431-40.
- Davies M. (2003) The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci*, 28: 263–274.
- Delis F, Benveniste H, Xenos M, Grandy D, Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK. (2012) Loss of dopamine D2 receptors induces atrophy in the temporal and parietal cortices and the caudal thalamus of ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 36: 815-25.
- U.S. Department of Health and Human Services. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Revista: *Alcohol Research & Health: Highlights From the Tenth Special Report to Congress, Health Risks and Benefits of Alcohol Consumption* (Volumen 24, Número 1, 2000 ed.) Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW. (2001) Apoptosis in the in vivo Mammalian Forebrain. *Neurobiol Dis*, 8: 359-379
- Draganski B, Kherif F, Klöppel S, Cook PA, Alexander DC, Parker GJ. (2008). Evidence for segregated and integrative connectivity patterns in the human basal ganglia. *J Neurosci*, 28: 7143–7152.
- Encuesta Nacional de Adicciones 2008, México
- Fadda F y Rossetti ZL. (1998) Chronic Ethanol Consumption: From Neuroadaptation to Neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 56: 385-431.
- Faingold CL. (2008) The Majchrowicz binge alcohol protocol: an intubation technique to study alcohol dependence in rats. *Curr Protoc Neurosci*, Capítulo 9:Unidad 9.28
- Faingold CL, Knapp DJ, Chester JA, Gonzalez LP. (2004) Integrative Neurobiology of the Alcohol Withdrawal Syndrome - From Anxiety to Seizures. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 268-278.
- Freund G y Anderson KJ. (1996) Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 1165-1172.
- Fulton T, Crews FT, Nixon K. (2009) Mechanisms of Neurodegeneration and Regeneration in Alcoholism. *Alcohol Alcohol*, 44: 115–127

- Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC. (2007) Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention. En: *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. (Riddle D.R. editor) Boca Raton (FL): CRC Press; 2007.
- Gianoulakis C. (2001) Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci*, 26: 304–318
- González Guzmán R., Alcalá Ramírez J. (2005) Consumo de alcohol y salud pública. UNAM.
- González-Pier E, Gutiérrez-Delgado C, Stevens G, Barraza-Lloréns M, Porrás-Condey R, Carvalho N, Loncich KH, Dias R, Kulkarni S, Casey A, Murakami Y, Ezzati M, Salomon JA. (2006) Priority setting for health interventions in Mexico's System of Social Protection in Health. *The Lancet*, 386: 1608-1618
- Grammatopoulos TN, Jones SM, Yoshimura M, Hoover BR, Das M, Snyder EY, Larson AG, Zahniser NR, Tabakoff B, Zawada WM. (2010) Neurotransplantation of stem cells genetically modified to express human dopamine transporter reduces alcohol consumption. *Stem Cell Res Therp*, 1:36
- Grant SA, Millar K, Kenny GN. (2000) Blood alcohol concentration and psychomotor effects. *Br J Anaesth*, 85: 401–406.
- Groenewegen H. (2007) The Ventral Striatum as an Interface Between the Limbic and Motor Systems. *CNS Spectr*. 12: 887-892
- Haber SN, Kim KS, Maily P, Calzavara R (2006). Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical inputs, providing a substrate for incentive-based learning. *J Neurosci*, 26: 8368–8376.
- Haber SN, Knutson B. (2009) The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35: 4-26
- Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V. (2010) Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci*, 42: 327-340.
- Hansson AC, Nixon K, Rimondini R, Damadzic R, Sommer WH, Eskay R, Crews FT, Heilig M. (2010) Long-term suppression of forebrain neurogenesis and loss of neuronal progenitor cells following prolonged alcohol dependence in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13: 583-593.
- Haroah J, Ramírez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. (2008) Mechanisms of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med*, 45: 1542-1550.
- Harper C. (2009) The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol Alcsm*, 44: 136-140.

- Harper C y Matsumoto I. (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol*, 5: 73–78
- Haseba T y Ohno Y. (2010) A new view of alcohol metabolism and alcoholism--role of the high-Km Class III alcohol dehydrogenase (ADH3). *Int J Environ Res Public Health*, 7:1076-92
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. (2003) Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 7919–7924.
- Hoffman P, Morrow L, Phillips T, Siggins G. (2000) Neuroadaptation to Ethanol at the Molecular and Cellular Levels. En: *Review of NIAAA's Neuroscience and Behavioral Research Portfolio, Monograph No. 34*, (Noronha M., Eckardt M., Warren K. eds), National Institutes of Health, Bethesda, MD, pp 85–188.
- Hughes JR. (2009) Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav*, 15: 92–97.
- Hungund BL, Basavarajappa BS, Vadasz C, Kunos G, Rodriguez de Fonseca F, Colombo G, Serra S, Parsons L, Koob GF. (2002) Ethanol, Endocannabinoids, and the Cannabinoidergic Signaling System. *Alcohol Clin Exp Res*, 26: 565-574.
- Hyttia P y Koob GF. (1995) GABA_A antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol*, 283: 151–159.
- Invitrogen (2006) DAPI Nucleic Acid Stain. Molecular Probes, Inc. OR, EUA.
- Johansson S, Ekström TJ, Marinova Z, Okvist A, Sheedy D, Garrick T, Harper C, Kuzmin A, Yakovleva T, Bakalkin G. (2009) Dysregulation of cell death machinery in the prefrontal cortex of human alcoholics. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12: 109-115.
- Kishimoto R, Fujiwara I, Kitayama S, Goda K, Nakata Y. (1995) Changes in hepatic enzyme activities related to ethanol metabolism in mice following chronic ethanol administration. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 41: 527-543.
- Kokavec A. (2008). Is decreased appetite for food a physiological consequence of alcohol consumption? *Appetite*, 51: 233-243
- Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. (1998) Neuroscience of Addiction. *Neuron*, 21: 467–476
- Koob GF. (1999) Drug Reward and Addiction. En: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond, M., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L., and Squire, L. R. eds.) Academic Press, San Diego pp. 1254–1279.
- Koob GF y Volkow ND. (2009) Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35: 217–238.

- Kristoffersen L, Skuterud B, Larssen BR, Skurtveit S, Smith-Kielland A. (2005) Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol dehydrogenase method. Optimization by experimental design. *J Anal Toxicol*, 29: 66-70.
- Lands WEM. (1998) A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*, 15: 147-160
- Leasure JL y Nixon K. (2010) Exercise Neuroprotection in a Rat Model of Binge Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, 34: 404–414
- LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C. (1994). Serotonin and ethanol intake, abuse and dependence: findings of animal studies. *Biol Psychiatry*, 36: 395–421.
- Leriche M y Méndez M. (2010) Ethanol exposure selectively alters beta-endorphin content but not [3H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain. *Neuropeptides*, 44: 9-16.
- Levitt MD y Levitt DG. (1998) Review: Use of a two-compartment model to assess the pharmacokinetics of human ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res*, 22: 1680-1688.
- Lieber CS.(1999) Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 991-1007.
- Lieber CS (1997) Cytochrome P450 2E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev*, 77: 517-544.
- Lipton P. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Rev*, 79: 1431-1568.
- Livy DJ, Parnell SE, West JB. (2003) Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol*, 29: 165–171
- Lovinger DM. (1993) Excitotoxicity and Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol Clin Exp Res*, 17:19-27.
- Lovinger DM. (1999) The Role of Serotonin in Alcohol's Effects on the Brain. *Current Separations* 18:1
- Lundqvist C, Alling C, Knoth R, Volk B. (1995) Intermittent ethanol exposure of adult rats: hippocampal cell loss after one month of treatment. *Alcohol Alclsm*, 30: 737-748.
- Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. (1989) Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol*, 36 :106-112.
- Matsumoto H y Matsumoto I. (2008) Alcoholism: protein expression profiles in a human hippocampal model. *Expert Rev Proteomics*, 5: 321-331
- Mayer S, Harris BR, Gibson DA, Blanchard JA, Prendergast MA, Holley RC, Littleton J. (2002) Acamprosate, MK-801, and ifenprodil inhibit neurotoxicity and calcium entry induced by ethanol withdrawal in organotypic slice cultures from neonatal rat hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res*, 26:1468–1478.

Mechtcheriakov S, Brenneis C, Egger K, Koppelstaetter F, Schocke M, Marksteiner J. (2007) A widespread distinct pattern of cerebral atrophy in patients with alcohol addiction revealed by voxel-based morphometry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78: 610-614.

Medina-Mora ME, Natera G, Borges G. (2002) Alcoholismo y abuso de bebidas alcohólicas. En: *Observatorio mexicano de tabaco, alcohol y otras drogas 2002*. CONADIC, SSA. México. ISBN 970-721-090-7.

Méndez M y Herrera S. (2012) Behavioral effects of alcohol in rodents. En: *Behavioral Animal Models* (Cruz-Morales S.E. y Arriaga-Ramírez P. eds.) Research Signpost 37/661, Fort P.O. Kerala, India 2012: 29-51.

Méndez M y Morales-Mulia M. (2008) Role of mu and delta opioid receptors in alcohol drinking behaviour. *Curr Drug Abuse Rev*, 1: 239-52.

Méndez M, Leriche M, y Calva JC. (2001) Acute ethanol administration differentially modulates mu opioid receptors in the rat meso-accumbens and mesocortical pathways. *Brain Res Mol Brain Res*, 94: 148-56.

McDonald AJ. (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci*, 985: 1-21.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY. (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, 14: 69–97.

Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K. (2010) Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*, 20: 596–607.

Morte MI, Carreira BP, Machado V, Carmo A, Nunes-Correia I, Carvalho CM, Araújo IM. (2013) Evaluation of proliferation of neural stem cells in vitro and in vivo. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 2:Unit 2D.14

Möykkynen T y Korpi ER. (2012) Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 111: 4-13.

Murphy BM y Martin SJ. (2002) Caspases: Structure, Activation Pathways, and Substrates. En: *Essentials of Apoptosis, A Guide for Basic and Clinical Research* (Yin X-M. y Dong Z. eds) Humana Press Inc., New Jersey, 2002.

Nagy J. (2008) Alcohol Related Changes in Regulation of NMDA Receptor Functions. *Curr Neuropharmacol*, 6: 39–54.

Nauta HJW. (1986) The relationship of the basal ganglia to the limbic system. En: *Handbook of Clinical Neurology: Extrapyramidal Disorders* (Vinken P.J., Bruyn G.W., Klawans J.J. eds) 5: 19–31.

- Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. (2001) Reinforcement and addictive disorders. *En: Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. Nueva York, NY: McGraw-Hill.
- Nixon K y Crews FT. (2004) Temporally Specific Burst in Cell Proliferation Increases Hippocampal Neurogenesis in Protracted Abstinence from Alcohol. *J Neurosci*, 24: 9714–9722.
- Nixon K y Crews FT. (2002) Binge alcohol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*, 83: 1087–1093.
- Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. (2002) Binge Ethanol Exposure in Adult Rats Causes Necrotic Cell Death. *Alcohol Clin Exp Res*, 26: 547-557
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT. (2002b) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 72: 521–532.
- Ogilvie K, Lee S, Rivier C. (1997) Effect of Three Different Modes of Alcohol Administration on the Activity of the Rat Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Alcohol Clin Exp Res*, 21: 467–476.
- Okamoto K, Mizuno M, Nakahara N, Natsume A, Yoshida J, Mori ., Hori S, Kobayashi H. (2002). Process of apoptosis induced by TNF- α in murine fibroblast Ltk-cells: Continuous observation with video enhanced contrast microscopy. *Apoptosis*, 7: 77–86.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota descriptiva N°349. Febrero de 2011.
- Ortiz S, Oliva JM, Pérez-Rial S, Palomo T, Manzanares J. (2004) Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol Alcohol*, 39: 88-92.
- Oscar-Berman M y Bowirrat A. (2005) Genetic influences in emotional dysfunction and alcoholism-related brain damage. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 1: 211–229.
- Oscar-Berman M. (2000) Neuropsychological Vulnerabilities in Chronic Alcoholism. *En: Review of NIAAA's Neuroscience and Behavioral Research Portfolio, Monograph No. 34*, (Noronha M., Eckardt M., Warren K. eds.), pp 85–188. National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Ozgur-Ilhan I, Demirbas H, Yalcin G.A, Yucesan C, Dogan YB. (2005) Alcoholic case of central pontine myelinolysis with mainly cerebellar signs. *Eur Addict Res*, 11 :155-156.
- Panés J, Caballería J, Guitart R, Parés A, Soler X, Rodamilans M, Navasa M, Parés X, Bosch J, Rodés J. (1993) Determinants of ethanol and acetaldehyde metabolism in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 48-53
- Pandey SC, Roy A, Zhang H. (2003) The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the

central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 27: 396-409.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH: (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17: 3727-3738.

Pawlak R, Skrzypiec A, Sulkowski S, Buczko W. (2002) Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 327: 83–86.

Paxinos G y Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier Academic Press*, 5a edición, 2005, EUA.

Petrascch-Parwez E, Nguyen HP, Löbbecke-Schumacher M, Habbes HW, Wiczorek S, Riess O, Andres KH, Dermietzel R, Von Hörsten S. (2007) Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *J Comp Neurol*, 501: 716-30.

Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Lim KO. (1997) Frontal lobe volume loss observed with magnetic resonance imaging in older chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 21: 521–529.

Pfefferbaum A, Sullivan EV, Mathalon DH, Shear PK, Rosenbloom MJ, Lim KO. (1995) Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 19: 1177-1191.

Phillips SC, Cragg BG. (1983) Chronic consumption of alcohol by adult mice: effect on hippocampal cells and synapses. *Exp Neurol*, 80: 218-26.

Phillips DE, Krueger SK, Rydquist JE. (1991) Short- and long-term effects of combined pre- and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on the development of myelin and axons in rat optic nerve. *Int J Dev Neurosci*, 9: 631–647.

Pikkarainen PH y Lieber CS. (1980) Concentration dependency of ethanol elimination rates in baboons: effect of chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res*, 4: 40-3.

Pohorecky LA. (1977) Biphasic action of ethanol. *Biobehavioral Reviews*, 1: 231–240

Poklis A y Mackell MA. (1982) Evaluation of a modified alcohol dehydrogenase assay for the determination of ethanol in blood. *Clin Chem*, 28: 2125-2127.

Prendergast MA, Harris BR, Blanchard JA 2nd, Mayer S, Gibson DA, Littleton JM. (2000) In vitro effects of ethanol withdrawal and spermidine on viability of hippocampus from male and female rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 24: 1855–1861.

Ramchandani VA, Kwo PY, Li TK. (2001) Effect of food and food composition on alcohol elimination rates in healthy men and women. *J Clin Pharmacol*, 41: 1345-1350.

Rassnick S, Pulvirenti L, Koob GF. (1992) Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* (Berl), 109: 92-98.

Roberts AJ. y Koob GF. (1997) The Neurobiology of Addiction: An Overview. En: Neuroscience: Pathways of Addiction. *Alc Res Hlth*, 21;101-106.

Rodriguez R y Redman R. (2005) Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 :3175-6.

Rosenbloom MJ, Rohlfing T, O'Reilly AW, Sassoon SA, Pfefferbaum A, Sullivan EV. (2007) Improvement in Memory and Static Balance with Abstinence in Alcoholic Men and Women: Selective Relations with Change in Brain Structure. *Psychiat Res*, 155: 91–102.

Rudolf E, Peychl J, Cervinka M. (2000) The dynamics of the hexavalent chromium induced apoptotic patterns in vitro. *Acta Medica* (Hradec Kralove), 43: 83-89.

Sahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgic S, Kaplan S, Tumkaya L. (2001) Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Analysis and Stereology*, 20: 9-13.

Salaspuro MP y Lieber CS. (1978) Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggregation after chronic consumption. *Ann Clin Res*, 10: 294-7.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. Molecular Cloning : A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a Edición, NY, EUA, 1989.

Schmued LC y Hopkins KJ. (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res*, 874: 123–130.

Steven MP. (2006) Alcohol-sensitive GABA receptors and alcohol antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 8307–8308.

Sullivan E y Pfefferbaum A. (2005) Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology*, 180: 583–594.

Switzer III RC. (2000) Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol*, 28: 70–83.

Taghipour M y Razmkon A. (2012) Isolation and growth of neural stem cells derived from adult human hippocampus. *J Inj Violence Res*, 4(3 Suppl 1)

Thanos PK, Volkow ND, Freimuth P, Umegaki H, Ikari H, Roth G, Ingram DK, Hitzemann R. (2001) Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J Neurochem*, 78: 1094-103.

Thompson SW. Selected histochemical and histopathological methods. Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1974.

- Ugoya SO y Tu J. (2012) Bench to Bedside of Neural Stem Cell in Traumatic Brain Injury. *Stem Cells Int*, 2012:141624
- van Eijk J, Demirakca T, Frischknecht U, Hermann D, Mann K, Ende G. (2013) Rapid partial regeneration of brain volume during the first 14 days of abstinence from alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 37: 67-74.
- Wang X y Michaelis EK. (2010) Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Front Aging Neurosci*, 2: 12
- Wilkins LH Jr, Prendergast MA, Blanchard J, Holley RC, Chambers ER, Littleton JM. (2006). Potential value of changes in cell markers in organotypic hippocampal cultures associated with chronic EtOH exposure and withdrawal: comparison with NMDA-induced changes. *Alcohol Clin Exp Res*, 30:1768-80.
- Yu BP. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74: 139–162.
- Zahr NM, Mayer D, Rohlfing T, Hasak M, Hsu O, Vinco S, Orduna J, Luong R, Sullivan E, Pfefferbaum A. (2009) Brain injury and recovery following binge ethanol: evidence from in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry*, 67: 846-54.
- Zahr NM, Kaufman KL, Harper CG. (2011) Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nature Reviews Neurology*, 7: 284-294.
- Zakhari S. (2007) Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alc Res Hlth*, 29: 245-254.
- Zakhari S. (1997). Alcohol and the cardiovascular system: Molecular mechanisms of beneficial and harmful action. *Alcohol Health Res World*, 21: 21-29.
- Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA. (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 30: 1500-1505.
- Zimatkin S y Deitrich R. (1997) Ethanol metabolism in the brain. *Addict Biol*, 2: 387-399.
- Zou JY, Martinez DB, Neafsey, EJ, Collins MA. (1996) Binge ethanol-induced brain damage in rats: effect of inhibitors of nitric oxide synthase. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 1406-1411.

12. Anexo

12.1. Soluciones generales

Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (Sambrook, 1989)

NaCl -----8 g

KCl-----0.2 g

Na₂HPO₄-----1.44 g

KH₂PO₄-----0.24 g

Agua destilada --- 800 ml

Ajustar el pH a 7.4. Aforar a 1 L con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

12.2. Soluciones para la tinción con violeta de cresilo (Paxinos y Watson, 1998)

Paraformaldehído 4%

Paraformaldehído ----- 40 g

PBS ----- 1000 ml

Disolver el paraformaldehído en la solución de PBS a 60°C; mezclar a esa temperatura y ajustar el pH a 7.4. Dejar enfriar. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

Acetato de sodio 1 M

Acetato de sodio ---- 13.6 g

Agua destilada----- 92 ml

Acido acético 1 N

Acido acético glacial --- 29 ml

Agua destilada ----- 471 ml

Violeta de cresilo

Para 500 mL, al 0.5 %, pH 3.9:

Violeta de cresilo ----- 2.5 g

Agua destilada ----- 300 ml

Acetato de sodio 1 M --- 30 ml

Acido acético 1 N ----- 170 ml

Mezclar la solución con agitador magnético por 7 días y filtrar. Guardar a temperatura ambiente en frasco ámbar. Proteger de la luz.

12.3. Soluciones para la tinción Fluoro-Jade B / DAPI (Invitrogen, 2006; Chemicon, 2013)

Permanganato de potasio 0.06%

Permanganato de potasio --- 0.015 g

Agua destilada ----- 25 ml

Acido acético 0.1%

Acido acético glacial ---0.1ml

Agua destilada ----- 9.9 ml

Solución "stock" Fluoro-Jade B 0.01%

Fluoro-Jade B (Chemicon) --- 0.001g

Agua destilada ----- 10 ml

Solución "stock" 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dilactato (DAPI) 0.01%

DAPI (Sigma-Aldrich) ----- 0.001g

Agua destilada ----- 10 ml

Solución de trabajo Fluoro-Jade B 0.0004% / DAPI 0.0001%

Solución "stock" Fluoro-Jade B ----0.16 ml

Solución "stock" DAPI ----- 0.04 ml

Acido acético 0.1% ----- 4.8 ml

Nota: La solución de trabajo debe prepararse 10 minutos antes de la aplicación a los cortes y no puede ser almacenada o reutilizada. Las cantidades a preparar indicadas para la solución de trabajo Fluoro-Jade B/DAPI y la solución de permanganato de potasio son suficientes para cubrir cinco portaobjetos.

12.4. Soluciones para la determinación de alcohol en sangre (Poklis y Mackell, 1982)

"Buffer" glicina-hidrazina 0.5 M pH 8.8

Agua destilada ----- 400 ml

Glicina (Sigma-Aldrich) ----- 18.77 g

Hidracina (Sigma-Aldrich) ----- 8.0 g

Aforar a 500ml con agua destilada. Ajustar pH a 8.8.

β -NAD (β -nicotinamida adenin dinucleótido) 1.8 μ M

"Buffer" glicina-hidracina ----- 100 ml

β -NAD (Sigma-Aldrich) ----- 1.194 g

Nota: para cada reacción se utilizan 100 μ l que contienen 1.194 mg

ADH (alcohol deshidrogenasa) 1500 unidades/ml

"Buffer" glicina-hidrazina ----- 100 ml

ADH (Sigma-Aldrich)----- 0.3 g

Nota: para cada reacción se utilizan 100 μ l que contienen 0.3 mg (150 unidades)