



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

CONSUMO VOLUNTARIO DE ETANOL MEDIANTE LA ELECCIÓN DE DOS BOTELLAS EN RATAS MACHO Y HEMBRA: REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL

Carles Colom Rocha

Máster Universitario en Neurociencias

(Especialidad/Itinerario: Ciencias de la Salud)

Centro de Estudios de Postgrado

Año Académico 2020-21

Consumo voluntario de etanol mediante la elección de dos botellas en ratas macho y hembra: regulación de la neurogénesis hipocampal

Carles Colom Rocha

Trabajo de Fin de Máster

Centro de Estudios de Postgrado

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Modelos preclínicos de adicción, etanol, neurotoxicidad, hipocampo, diferencias entre sexos.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Dra. M^a Julia García Fuster

IUNICS, Departamento de Medicina

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Alcoholismo y epidemiología	3
2.2. Vías de recompensa y desarrollo de adicción; Papel del hipocampo.....	4
2.3. Consecuencias neuroquímicas del consumo de alcohol: inhibición de la neurogénesis hipocampal adulta.....	8
2.4. Diferencias de sexo en la vulnerabilidad a la adicción.....	10
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Animales en experimentación.....	13
4.1.1. Condiciones de estabulación.....	13
4.1.2. Manejo de los animales.....	13
4.2. Diseño experimental para evaluar el consumo de alcohol voluntario	13
4.3. Recogida de muestras cerebrales.....	14
4.4. Estudio inmunohistoquímico	14
4.5. Contaje celular.....	15
4.6. Análisis de los resultados.....	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Evolución del consumo líquido en dieta y del peso de los animales en experimentación	16
5.2. Análisis del consumo voluntario y preferencia de etanol	17
5.3. Efectos del modelo de consumo voluntario intermitente de etanol sobre la proliferación celular hipocampal.	20
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES	25
8. AGRADECIMIENTOS	26
9. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. RESUMEN

El alcohol es una de las sustancias psicoactivas más consumidas por la sociedad actual y su consumo es un hábito extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de sociedades occidentales. Su consumo excesivo está asociado a daño cerebral y deterioro del funcionamiento cognitivo. La forma y el contexto en las que se consume esta sustancia actúan como efecto reforzante, favoreciendo el desarrollo de adicción mediante alteraciones en la vía de recompensa mesolímbica (con la que se relaciona el hipocampo). Con el presente trabajo se pretende poner a punto un modelo en animales de experimentación (consumo intermitente de etanol al 20% mediante la elección de dos botellas) que permita la adaptación del prototipo de consumo humano caracterizado por la escalada gradual del consumo moderado a excesivo de etanol, y además aportar conocimiento sobre cómo el consumo afecta a la plasticidad neuronal (i.e., regulación de las primeras fases de la neurogénesis hipocampal). Demostramos que con el modelo empleado no se consigue la escalada gradual de consumo esperada con la exposición repetida e intermitente de etanol, pero sí encontramos evidencias de una mayor vulnerabilidad de las ratas hembra en cuanto a la concentración consumida y la neurotoxicidad causada por el consumo de alcohol. Con este estudio se ha caracterizado el modelo de consumo voluntario intermitente de alcohol, que tras ciertas modificaciones que aplicaremos en el paradigma en futuros experimentos, nos permitirá conseguir la adaptación del modelo prototípico de consumo en humanos a animales de experimentación para facilitar así la búsqueda de correlaciones entre resultados conductuales y análisis neuroquímicos de plasticidad y/o toxicidad neuronal, con una perspectiva de sexo.

1. ABSTRACT

Alcohol is one of the most consumed psychoactive substances by today's society and its consumption is a widespread and culturally accepted habit in most occidental societies. Its excessive consumption is associated with brain damage and impaired cognitive functions. The form and context in which this substance is consumed act as a reinforcing effect, favoring the development of addiction through alterations in the mesolimbic reward pathway (in relation with the hippocampus). The present work aims to characterize a model in experimental animals (intermittent consumption of 20% ethanol by choosing from two bottles) that allows the adaptation of the human consumption prototype characterized by the gradual escalation of moderate to excessive consumption of ethanol, and also provides a platform in which to study how drug consumption affects neuronal plasticity (i.e., regulation of the first phases of hippocampal neurogenesis). The data showed that the model used did not achieve the gradual escalation of consumption expected, but showed evidence of a greater vulnerability in female rats in terms of the concentration consumed and the neurotoxicity caused by alcohol (impaired hippocampal neurogenesis). Future experiments will apply certain modifications to the current paradigm to allow us to achieve the prototypical escalation in consumption observed in humans. This will facilitate the search for correlations between behavioral results and neurochemical analysis of neuronal plasticity and/or toxicity induced by ethanol consumption, with a sex perspective.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Alcoholismo y epidemiología

El alcohol es una de las sustancias psicoactivas más consumidas por la sociedad, su consumo, al estar legalizado, es un hábito ampliamente extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de las sociedades occidentales. De acuerdo con el *Global Status Report on Alcohol and Health* (World Health Organisation, 2018), en 2016 el uso nocivo del alcohol causó aproximadamente 3 millones de muertes (5,3% del total) en todo el mundo, de las cuales se estimó que un 77% correspondía a varones y un 23% a mujeres. Los niveles de mortalidad causados por este hábito son mayores que los causados por enfermedades como la tuberculosis, el HIV/AIDS o la diabetes. Aproximadamente el 49% de los AVAD (Años de Vida Ajustados por Discapacidad, una medida de carga de la enfermedad global, expresado como el número de años perdidos debido a enfermedad, discapacidad o muerte prematura) relacionados con el alcoholismo se deben a enfermedades mentales y no transmisibles, y alrededor del 40% es debido a lesiones derivadas.

Según la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD) el alcohol lideró el año pasado la lista de drogas legales con mayor prevalencia de uso en España entre la población entre 15-64 años, y junto al tabaco, fue la sustancia psicoactiva más comúnmente utilizada en edades tempranas. En 2019/2020 el 77,2% de esta población consumió alcohol y un 8,8% lo consumió a diario. La prevalencia en el consumo de alcohol se ha mantenido estable desde la década de los 90, cabe destacar la tendencia a la baja de los bebedores diarios desde 2001, que alcanzó el valor más bajo de toda la serie histórica en 2017, pero incrementándose en más de un punto en 2019/2020 (Ministerio De Sanidad, 2020).

Uno de los principales problemas que implica el consumo de alcohol, es que es a menudo consumido antes, simultáneamente o después, con otras sustancias psicoactivas, y la comorbilidad entre el alcohol y la dependencia al tabaco (droga que más muertes causa en el mundo) está bien documentada (Ryder et al., 2018). Por tanto, debe ser una prioridad para las políticas, estrategias e intervenciones de salud pública el tener en cuenta la asociación frecuente del consumo de alcohol con el uso de otras sustancias psicoactivas, en particular con opioides y benzodiazepinas, para la prevención de muertes por sobredosis, y con el cannabis, para la seguridad vial.

Las pautas normales de consumo de alcohol en humanos suelen ajustarse al contexto, varían de una persona a otra y en gran parte están determinadas por las convenciones sociales. Tras el primer contacto con el alcohol, el consumo de esta

sustancia de abuso suele presentarse de manera intermitente asociándose a contextos sociales como reuniones, celebraciones o fines de semana, donde el consumo suele ser en forma de atracones (*binge*), seguido de periodos sin consumo. Este abuso de la sustancia tiene capacidad de actuar como un agente reforzante, y como consecuencia, se promueven patrones de conducta como los comportamientos de búsqueda y consumo de la droga que, junto al desarrollo de tolerancia y sensibilización por la sustancia, provocan un incremento del consumo progresivo. Tras una autoadministración continua y persistente, se puede llegar a perder el control sobre el comportamiento, por lo que las conductas de búsqueda y consumo se vuelven compulsivas conduciendo al desarrollo de adicción.

Uno de los principales desafíos en los estudios preclínicos sobre el abuso y la dependencia del alcohol sigue siendo el desarrollo de paradigmas que capturen esta alta ingesta de etanol mimetizando los efectos de los atracones y la transición progresiva del consumo social bajo o moderado al consumo excesivo de alcohol. Son varios los modelos empleados en animales de experimentación que demuestran un aumento en el consumo de etanol a través de ciclos repetidos de acceso libre al etanol y abstinencia, y son particularmente útiles como modelos válidos para el estudio de aspectos relacionados con el abuso del alcohol (Carnicella et al., 2014). Los modelos animales de consumo de alcohol en forma de atracones han progresado desde inyecciones agudas de cantidades de alcohol suficientes para producir síntomas similares a la intoxicación, procedimientos de elección de dos botellas durante periodos de 24 horas, hasta episodios de autoadministración que produzcan niveles de alcohol en sangre equivalentes al consumo excesivo de alcohol en humanos (Crabbe et al., 2011). El modelo de acceso intermitente a etanol al 20% mediante la elección de dos botellas y los procedimientos operantes relacionados han demostrado la posibilidad de mimetizar múltiples aspectos del abuso y adicción al alcohol en ratas, incluida la transición del consumo social al consumo excesivo, la búsqueda compulsiva, las recaídas y las neuroadaptaciones asociadas a la ingesta abusiva de alcohol (Carnicella et al., 2014). Con el presente estudio se quiso caracterizar mediante la utilización de este modelo animal de consumo voluntario de etanol por elección entre dos botellas la progresión en el consumo en ratas macho y hembra.

2.2. Vías de recompensa y desarrollo de adicción: Papel del hipocampo.

La adicción es considerada una enfermedad crónica y recurrente que altera los circuitos de recompensa cerebral, la motivación del individuo, su memoria, así como el resto de circuitos relacionados, y cuya disfunción conduce a manifestaciones biológicas, psicológicas y sociales. Esto se refleja en un individuo que persigue patológicamente la recompensa y/o el alivio mediante el uso de sustancias y otras conductas. Se caracteriza por la incapacidad de mantener la abstinencia, el deterioro

en el control de la conducta, el deseo, la disminución del reconocimiento de problemas significativos en los comportamientos y relaciones interpersonales, y una respuesta emocional disfuncional. Sin tratamiento o participación en actividades de recuperación, la adicción es progresiva y puede resultar en discapacidad o muerte prematura.

Los circuitos cerebrales implicados en el desarrollo de este fenómeno son las conexiones de la vía mesolímbica (véase [Figura 1](#)), a la cual se le atribuye la función de experimentar placer y recompensa, así como la motivación y el aprendizaje emocional o por refuerzo (Martín Bustos, 2008). Consta de un conjunto de proyecciones neuronales dopaminérgicas desde el área tegmental ventral, en el mesencéfalo, hasta el cuerpo estriado ventral, donde se incluye el núcleo accumbens (NAc). Además, se relaciona con otras estructuras como la amígdala, el hipocampo o la corteza prefrontal. Juega un rol crucial en la fijación de relevancia motivacional para recompensas naturales (como los estímulos sociales, novedosos o relacionados con la comida), así como las drogas de abuso en las que se incluye en alcohol (Robinson & Berridge, 2003). La liberación de dopamina en estas regiones, se considera que está modulada por el consumo de drogas de abuso (Luo et al., 2011).

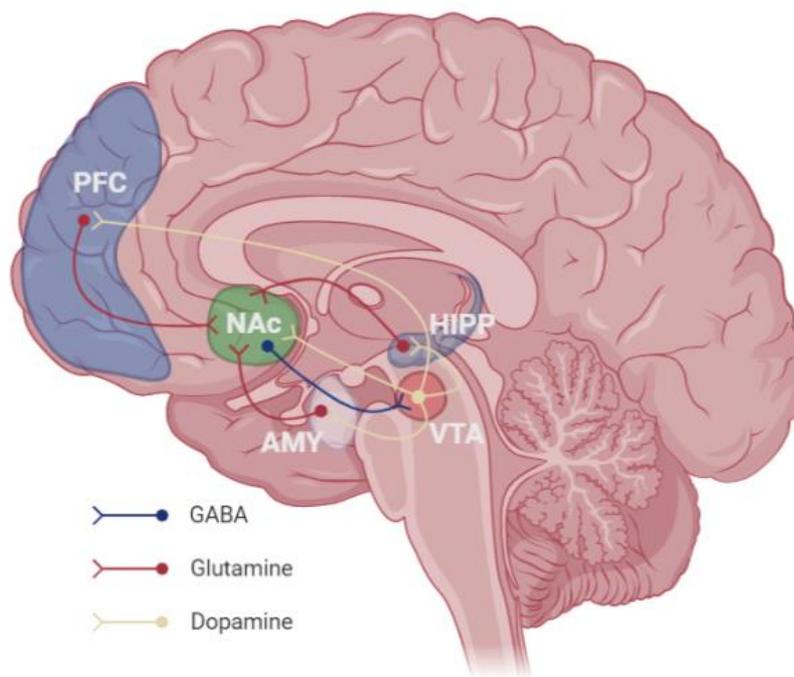


Figura 1 – Diagrama que muestra algunos de los componentes clave del circuito mesolímbico involucrados en la experimentación de la recompensa o del placer, así como la sensación de motivación y el aprendizaje por refuerzo emocional. Incluye vías dopaminérgicas (amarillo), GABA-érgicas (azul) y glutaminérgicas (rojo), entre el área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens (NAc), corteza prefrontal (PFC), amígdala (AMY) e hipocampo (HIPP). Imagen creada por George V. Kach bajo la licencia [Attribution-Share Alike 4.0 International](#).

Una premisa general en adicción es que el uso inicial o agudo de alguna droga facilita el desarrollo de recuerdos y asociaciones inadaptados entre los efectos de la sustancia y los estímulos ambientales, y esta memoria asociativa puede ejercer un fuerte efecto en los comportamientos de ansia por consumir, llevando a una recaída (Bienkowski et al., 1996). Junto al consumo continuo, surgen déficits cognitivos y de aprendizaje que, combinados con las asociaciones inadaptadas entre el efecto y los estímulos ambientales, contribuyen al desarrollo de la adicción.

El hipocampo es probablemente la región cerebral principal asociada al aprendizaje y memoria, con una importancia crítica en la formación de memorias declarativas a largo plazo (Opitz, 2014). Como parte de este rol, el hipocampo es esencial para agrupar información y formar representaciones más complejas (Sutherland & Rudy, 1989) necesarias para la memoria contextual y espacial. Además, el hipocampo es una de las regiones con mayor grado de plasticidad sináptica, a menudo evaluado por cambios en la potenciación a largo plazo (LTP) (Lømo, 2018). Por tanto, el alto grado de plasticidad hipocampal y la capacidad de esta región para acoplar recuerdos contextuales y declarativos pueden facilitar cambios inducidos por sustancias de abuso en la función del hipocampo, con un efecto penetrante en los comportamientos y la conducta.

La neurogénesis adulta consiste en un proceso a través del cual se forman neuronas funcionales utilizando como precursor células progenitoras. El hipocampo y los bulbos olfatorios son dos regiones en las que se ha descrito este proceso proliferativo en mamíferos. Que se produzca esta neurogénesis implica mecanismos de plasticidad sináptica, siendo esta un mecanismo de aprendizaje y memoria (Chambers et al., 2004; Luu et al., 2012). En el presente estudio, nos centraremos en la proliferación celular en una zona concreta del hipocampo, el giro dentado (véase [Figura 2](#), Mandyam & Koob, 2012), formado por agrupaciones muy densas de somas neuronales de pequeña dimensión, entre las cuales encontramos las células granulares. El marcador Ki-67 fue el elegido en este estudio para evaluar los índices de proliferación celular. Su nombre se refiere al clon original del anticuerpo identificado en proteínas asociadas al ciclo celular, codificado en el cromosoma 7 de ratones, y aparece durante la progresión del ciclo celular (Sun & Kaufman, 2018). Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede detectarse únicamente en el núcleo celular, que está presente durante todas las células activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G0) (Nakamura et al., 2005). Durante la mitosis, esta proteína se traslada a la superficie de los cromosomas, permitiendo visualizar células que estén en división en ese preciso instante.

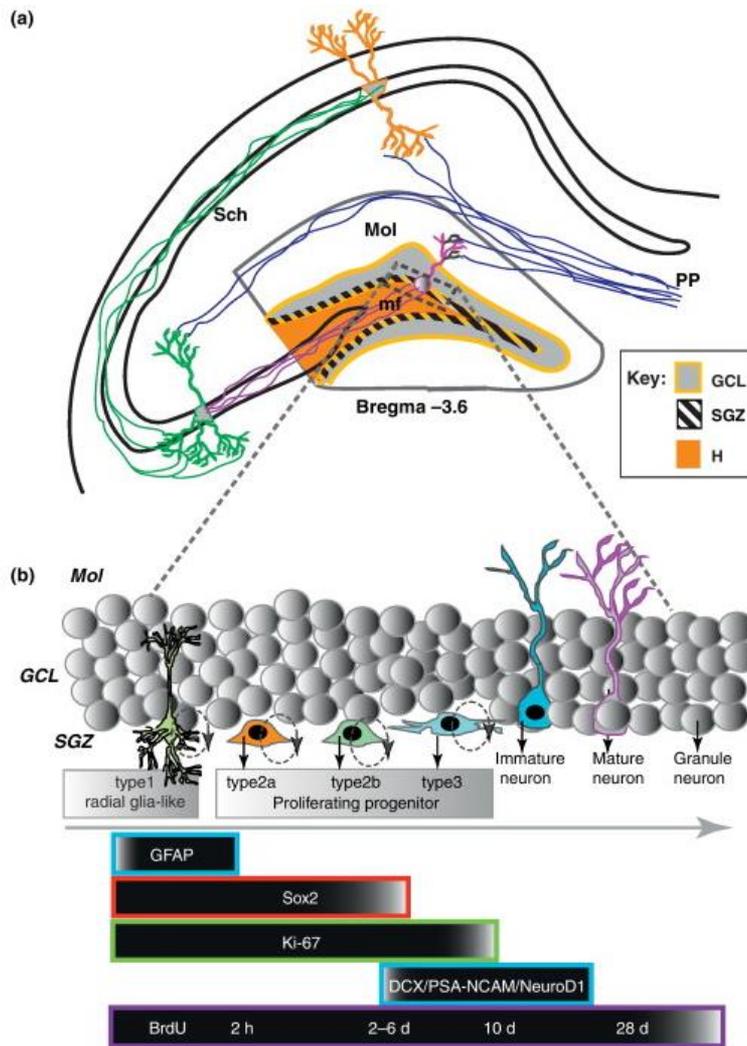


Figura 2 – Esquema de la sección coronal a través del hipocampo cerebral de rata y distintos tipos celulares. (a) Giro dentado (DG) del hipocampo a una distancia de -3,6 mm del Bregma (DG; naranja, negro y gris). Se indican las vías trisinápticas del hipocampo: vía prefrontal (PP) con las conexiones en color lila, fibras musgosas (mf) con sus conexiones en color rosa, y las colaterales de Schaffer (Sch) con sus conexiones en verde. El DG se divide en la capa molecular (Mol), la capa de células granulares (GCL, en gris), y el hilio (H, en amarillo). La zona subgranular (SGZ) se representa con un área con rayas negras entre la capa de células granulares y el hilio. (b) Representación aumentada de las neuronas de la capa granular (GCL). El esquema del hipocampo muestra una secuencia preneuronal, neuronal temprana y los tipos de células postmitóticas durante la neurogénesis postnatal. Las células nacen como células radiales de la glía, como células madre (*type 1*) y van dividiéndose poco a poco para producir células del tipo 2 (*type 2a* y *2b*). Estas se van dividiendo rápidamente hasta diferenciarse en células inmaduras (*type 3*), dando neuronas inmaduras, que se convertirán en neuronas maduras y finalmente en células granulares maduras. También se representan varios marcadores de proliferación endógenos como el Ki-67, utilizado en este estudio, que puede ser usado para determinar el número de células proliferantes (Imagen de Mandyam & Koob, 2012).

2.3. Consecuencias neuroquímicas del consumo de alcohol: Inhibición de la neurogénesis hipocampal adulta

El consumo excesivo de alcohol puede desencadenar en una serie de enfermedades graves, dañando especialmente órganos como el hígado, páncreas y cerebro (Albanese, 2012). Debido a su bajo peso molecular y solubilidad en agua, el etanol se distribuye prácticamente por todos los tejidos, pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al sistema nervioso central, teniendo efectos neurotóxicos (De La Monte & Kril, 2014; Charness, 1993). Los mayores efectos observados tras el abuso prolongado del alcohol son una pérdida desproporcionada de sustancia blanca cerebral y alteraciones de la función ejecutiva (Nunes et al., 2019), así como la aparición de deterioro neurocognitivo y déficits en el aprendizaje y la memoria (White, 2003). Aunque todas las células del sistema nervioso son vulnerables a los efectos tóxicos, metabólicos y degenerativos del alcohol, los astrocitos, los oligodendrocitos y los terminales sinápticos son las principales dianas, lo que explica esta atrofia de la sustancia blanca, la inflamación y toxicidad neural, y las alteraciones en la sinaptogénesis (De La Monte & Kril, 2014). El consumo de etanol también ejerce efectos neurotóxicos y teratogénicos devastadores en el cerebro en desarrollo en su asociación con los trastornos del espectro alcohólico fetal (Denny et al., 2017).

Los mecanismos neurotóxicos asociados al consumo de alcohol han sido minuciosamente estudiados en los últimos años, abordando cuestiones como el efecto tóxico de su metabolito (acetaldehído), la neuroinflamación, cambios en el metabolismo cerebral, disfunción mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno y cambios en las vías dopaminérgicas y glutamatérgicas (Pereira et al., 2015). A pesar de los muchos estudios realizados, la neurobiología del alcoholismo no se conoce tan bien como la de muchas otras drogas psicoactivas, ya que su mecanismo de acción es inespecífico y ejerce sus efectos en un amplio rango de sistemas de neurotransmisión, entre los cuales destacan el ácido gammaaminobutírico (GABA) y el sistema opioide, aunque también media efectos con la dopamina, el glutamato y la serotonina (Lovinger, 2008).

El alcohol afecta las funciones cerebrales interactuando con múltiples sistemas de neurotransmisión, un ejemplo de ello es como altera el delicado equilibrio entre el GABA, principal neurotransmisor inhibitorio, y el glutamato, el neurotransmisor excitatorio por excelencia del sistema nervioso central que media sus efectos a través de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Fernando Valenzuela, 1997). El consumo agudo inclina este equilibrio incrementando el efecto del GABA sobre los receptores GABA-A resultando en un descenso de la excitabilidad cerebral (Bayard et al., 2004). Estos hechos justifican la caracterización del alcohol como un depresor del sistema nervioso central, ya que actúa potenciando la inhibición y reduciendo la

excitación, y justifica muchos de sus efectos tóxicos, amnésicos y atáxicos. Con el uso crónico, el cerebro activa sistemas compensatorios para recuperar el balance, como por ejemplo el incremento en la regulación de receptores NMDA o un descenso en la respuesta al GABA por parte del receptor GABA-A (Bayard et al., 2004), y son estos cambios neurológicos los que implican el desarrollo de tolerancia frente a los efectos sedantes del alcohol. En el momento que este consumo cesa o se reduce abruptamente, los sistemas compensatorios ya no se oponen a la presencia de alcohol, resultando en una hiperexcitabilidad cerebral debida a que los receptores previamente inhibidos por el alcohol dejan de hacerlo, y dando paso a las manifestaciones clínicas asociadas a la abstinencia como ansiedad, irritabilidad, agitación y temblores (Bayard et al., 2004; Chang & Steinberg, 2001). Todas estas modificaciones en los diferentes sistemas de neurotransmisión dan paso al desarrollo de la tolerancia y la dependencia (Koob et al., 1998). La recaída en el consumo de alcohol implica elementos impulsivos y compulsivos que desembocan en un ciclo de adicción formado por tres fases: *binge* (atracción que lleva a la embriaguez), *withdrawal/negative affect* (abstinencia/conducta afectiva negativa) y *craving* (ansia o deseo por la sustancia) (Liang & Olsen, 2014). Los estudios realizados con neuroimagen en humanos y otros animales han revelado algunos de los circuitos involucrados en estas tres etapas del ciclo de la adicción, destacando zonas cerebrales como el área tegmental ventral (VTA), el cuerpo estriado ventral, el hipocampo y la amígdala, tal y como se ha detallado con brevedad anteriormente (véase [Figura 1](#)). Los fenómenos de neuroplasticidad que afectan a estas áreas y conducen a la adicción podrían iniciarse como cambios en el sistema dopaminérgico de la vía mesolímbica que desencadena una cascada de neuromodulaciones desde el estriado central hacia el dorsal (Koob & Volkow, 2010). Otro fenómeno a tener en cuenta es que se ha demostrado que el consumo crónico de sustancias de abuso aumenta el contraste de la liberación fásica de dopamina a los niveles basales en respuesta a estímulos asociados al consumo, lo que desemboca en un posible reconocimiento anormal de señales y reforzantes, favoreciendo el desarrollo de adicción (Volkow et al., 2009). Este incremento en los niveles tónicos de dopamina causados por la administración repetida de una sustancia debería oponerse a la liberación fásica de dopamina mediante la estimulación de autorreceptores terminales de dopamina, lo que hace que el consumidor aumente la dosis para poder restaurar la respuesta fásica (Grace, 2000). Existen evidencias de que las alteraciones en la vía dopaminérgica observadas en alcohólicos tienen un origen GABAérgico, ya que los receptores dopaminérgicos D2 del cuerpo estriado están localizados principalmente en neuronas GABAérgicas (Volkow et al., 1996). Por lo tanto, las alteraciones dopaminérgicas en los circuitos neuronales implicados en las vías de recompensa, particularmente el VTA, el núcleo accumbens (NAcc), la amígdala y corteza prefrontal, son mecanismos subyacentes que conducen a una situación de dependencia al alcohol (Hietala et al., 1994).

Los efectos del alcohol sobre el proceso neurogénico en el hipocampo adulto ha sido un tema de interés para la comunidad científica en estos últimos años. Uno de estos estudios demostró que un atracón agudo (*binge*) provocaba un descenso en los niveles de proliferación celular en el giro dentado del hipocampo (Nixon & Crews, 2002). También se pudo observar una disminución de la neurogénesis hipocampal en ratones que consumían alcohol de manera autoadministrada, en los cuales se redujo el número de células marcadas con BrdU (un análogo de timidina que se administra de manera exógena para marcar las células de nueva proliferación), pero este efecto se revertía cuando los animales realizaban ejercicio físico (Crews et al., 2004). Es un hecho que el abuso del alcohol tiene efectos negativos sobre la neurogénesis hipocampal adulta, pero es muy importante considerar que estos efectos son dependientes de muchos factores como la edad, el patrón de consumo y el tiempo de exposición (Goodlett et al., 2005). Los mecanismos por los cuales el consumo de alcohol afecta a este proceso fueron descritos por Morris et al. (2010), los cuales estudiaron este fenómeno en un modelo de consumo con ratas adolescentes y describieron dos mecanismos que alteran la neurogénesis hipocampal: disminuyendo el número de células en proliferación y aumentando la muerte celular y, por lo tanto, reduciendo la supervivencia de nuevas células en el giro dentado del hipocampo. Las teorías emergentes sobre la contribución de la neurogénesis a la función del hipocampo implican que, tal y como se ha mencionado anteriormente, la desregulación de la neurogénesis provocada por el consumo de alcohol probablemente contribuya a deficiencias en los comportamientos asociados con esta región, como el aprendizaje, la memoria y el estado de ánimo, y pueda tener implicaciones para el desarrollo del abuso o adicción al alcohol (Canales, 2007).

2.4. Diferencias de sexo en la vulnerabilidad a la adicción

Existe una evidencia creciente en humanos y modelada en animales de experimentación sobre la existencia de diferencias entre sexos en las bases biológicas que marcan la vulnerabilidad frente a cada una de las etapas que categorizan la adicción, hallándose diferencias en cada una de ellas: tanto en los efectos reforzantes agudos, en la transición del uso ocasional al compulsivo, así como en los estados afectivos negativos asociados con la abstinencia, el ansia y las recaídas (Becker & Chartoff, 2019). Sin embargo, también se ha demostrado que no existen diferencias significativas entre sexos en muchos de los aspectos cualitativos en las fases de la adicción, pero si la posibilidad de que un sexo muestre un rasgo más que el otro, lo que resulta en diferencias poblacionales (Becker & Chartoff, 2019). Por ejemplo, a pesar de que muchos más hombres consumen drogas de abuso, en las mujeres consumidoras la progresión hacia la adicción tiene un pronóstico mucho peor (Quigley et al., 2021).

Una de las premisas que marcan esta distinta vulnerabilidad es la forma en la cual el estradiol, una hormona gonadal, interactúa con el sistema dopaminérgico ascendente del telencéfalo provocando esta desigualdad sexual en los comportamientos motivados por la sustancia de abuso. En roedores, por ejemplo, se ha demostrado que la exposición repetida a psicoestimulantes provoca una mayor sensibilización incentiva por las drogas en hembras que en machos (Van Haaren & Meyer, 1991). El estradiol provoca un aumento en la motivación del sexo femenino por el consumo, con un incremento en el valor de los efectos reforzantes relacionados con las drogas, lo que desemboca en una mayor susceptibilidad a las recaídas (Quigley et al., 2021). En los hombres, la evidencia reciente sugiere que el estradiol puede ser un agente protector contra la susceptibilidad frente a la preferencia por el consumo de una sustancia de abuso (Quigley et al., 2021).

Por tanto, el rol que tienen las hormonas gonadales a la hora de alterar la conducta por querer consumir drogas es una evidencia. Como se ha comentado, el estradiol en mujeres potencia los niveles de dopamina inducidos por el consumo de drogas en regiones cerebrales que regulan el comportamiento de búsqueda habitual de la sustancia; a mayor concentración de estradiol en mujeres, mayor será la motivación mostrada por el consumo de la droga. A esto hay que sumarle el hecho de que el estrés, tanto crónico como agudo, aumenta la conducta motivacional por la búsqueda de drogas en ambos sexos, pero este efecto es más remarcado en mujeres debido al efecto del estradiol en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Becker & Chartoff, 2019). El estrés prenatal es otro factor que afecta a la vulnerabilidad, si bien es cierto que afecta a ambos sexos a la hora de consumir drogas en la edad adulta, estos efectos son mediados por diferentes mecanismos (Thomas & Becker, 2019). En la etapa adolescente, el hecho de que existan diferencias entre ambos sexos en la presencia de trastornos del estado de ánimo, siendo las mujeres quien más los manifiesten, hacen que aparezca el impulso de consumir sustancias de abuso con el fin de automedicarse (Quigley et al., 2021).

Vistas estas diferencias biológicas entre sexos en las distintas bases de la adicción, y dada la escasez de estudios pre-clínicos que comparan ambos sexos, en este estudio nos centramos en evaluar posibles diferencias en el consumo voluntario de etanol entre sexos utilizando un modelo bien caracterizado en la literatura.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es estudiar el consumo voluntario de etanol en ratas macho y hembra mediante el modelo de elección entre dos botellas, valorar las posibles diferencias entre ambos sexos y buscar una posible correlación con marcadores de plasticidad neuronal (regulación de los primeros estadios de la neurogénesis hipocampal)

Los objetivos específicos son:

1. Puesta a punto del modelo de consumo voluntario de etanol mediante la elección de dos botellas en rata adulta; y realizar una comparación entre sexos.
2. Evaluar como marcador de plasticidad neuronal la regulación de las primeras fases de la neurogénesis hipocampal.
3. Examinar una posible relación entre los resultados conductuales y los obtenidos en los análisis neuroquímicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales en experimentación

4.1.1. Condiciones de estabulación

Para la realización de este estudio se utilizaron ratas (n=42) de ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley comprendidas en el rango de edad adultas (mayores de PND≈60) criadas en el estabulario de la Universitat de les Illes Balears (UIB). Durante el procedimiento los animales fueron alojados de manera individual (para poder evaluar su consumo) en jaulas con material absorbente esterilizado elaborado a partir de madera, con acceso a alimentación y agua *ad libitum* (pienso estándar y agua descalcificada) y condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 horas de luz/oscuridad de 08:00 a 20:00 y de 20:00 a 08:00 h, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y 70% de humedad).

4.1.2. Manejo de los animales

Antes de empezar el proceso experimental, durante dos días, se habituó a las ratas a ser manipuladas por el experimentador y acostubrándolas a las condiciones de la fase experimental, como por ejemplo el acceso a agua en dos botellas diferentes. La manipulación y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices éticas estándar (U.K. Animals, Scientific Procedures, Act, 1986 and European Communities Council Directive 86/609/EEC) y aprobados por el Comité Local Bioético (UIB-CAIB) procurando evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los animales. El número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad máxima de los resultados.

4.2. Diseño experimental para evaluar el consumo de alcohol voluntario

Las 42 ratas se dividieron en cuatro grupos experimentales: machos control (n=10), hembras control (n=10), machos etanol (n=11) y hembras etanol (n=11). El paradigma de consumo de etanol al 20% con acceso intermitente aplicado a este estudio es una adaptación de Simms et al., 2008, que consiste en que los animales tuvieron acceso a etanol tres sesiones seguidas de 24 horas por semana (martes, miércoles y jueves), durante seis semanas. Tras un período de aclimatación al alojamiento individual, las ratas de los grupos etanol que no tenían experiencia previa en el consumo, tuvieron acceso a 1 botella de etanol al 20% v/v y 1 botella de agua durante las tres sesiones. Una vez finalizadas, se retiró la botella de etanol y se sustituyó por una de agua, por lo que las ratas tuvieron acceso ilimitado a dos botellas de agua hasta el inicio de las sesiones en la semana posterior. El grupo control tuvo acceso durante todo el

procedimiento a dos botellas de agua. Se alternó diariamente la localización de las botellas de todos los grupos para evitar las preferencias laterales en los animales. Cada botella fue pesada diariamente para calcular el volumen diario consumido de agua y etanol (g consumidos). También se pesó a cada animal una vez por semana para medir la evolución del peso durante el transcurso del procedimiento y poder calcular las dosis consumidas (g/kg). Finalmente, se calcularon las preferencias de cada animal por el consumo de etanol vs. Agua (g etanol / g etanol + g agua) por sesión diaria o por semana.

4.3. Recogida de muestras cerebrales

Una vez finalizado el periodo experimental, los animales fueron sacrificados mediante decapitación tras la última sesión de consumo de etanol. Se extrajo el cerebro de cada una de las ratas y se diseccionaron en una placa de aluminio a 4 °C, cortándose de forma sagital para la separación de los hemisferios. El hemisferio izquierdo se congeló rápidamente en una solución de isopentano entre -20 y -30 °C y se almacenó a -80 °C para ser cortado posteriormente en cortes histológicos de 30 µm en el criostato. Estos cortes comprendían el largo de toda la extensión del hipocampo (desde -1,72 a -6,80 mm de Bregma), que se iban montando en portaobjetos (8 secciones por portaobjetos). Las secciones hipocampales se mantuvieron a -80 °C hasta la posterior realización del análisis de marcadores de proliferación celular (Ki-67) mediante técnicas inmunohistoquímicas. Del hemisferio derecho se extrajeron el hipocampo y el córtex prefrontal que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C para su uso en próximos experimentos (no relacionados con el presente trabajo).

4.4. Estudio inmunohistoquímico

En este estudio se observó el efecto del consumo de etanol al 20% sobre la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de rata utilizando el marcador endógeno Ki-67 (Scholzen & Gerdes, 2000) para marcar las células en proliferación de las secciones hipocampales. Como se ha descrito anteriormente en detalle (García-Fuster et al., 2010), se realizó el marcaje de las células de nueva proliferación en 3 portaobjetos por animal que contienen 8 secciones de tejido hipocampal cada uno (24 secciones en total; cada octava sección a lo largo de la extensión total del hipocampo). Las secciones se fijaron posteriormente en 4% de paraformaldehído seguido de varios pasos como la exposición del antígeno (10% de citrato de sodio a pH 6,0, 90°C durante 1 h) y el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución H₂O₂ al 0,3% (60 ml stock al 3% + 540 ml PBS). Finalizado este paso y tras tres lavados con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) se sellaron cuidadosamente los bordes de los portaobjetos con un rotulador (PAP PEN) que impermeabilizaba la superficie para

evitar que las muestras perdieran líquido, sin dañar ninguna muestra. A continuación, se incubaron las muestras en cámaras de hibridación con una solución bloqueadora constituida por albúmina de suero bovino (BSA) que contenía suero de cabra al 2% y Triton X-100 al 0,05% evitando las uniones inespecíficas del anticuerpo e incrementando la probabilidad de que solo se una a su respectivo antígeno. El siguiente paso fue la incubación de las muestras durante toda una noche con el anticuerpo policlonal Ki-67 de conejo (1:40000) y a continuación se administró el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (1:1000). La unión del anticuerpo se detectó gracias al complejo Avidina/Biotina (45 μ l de Avidina + 45 μ l de Biotina en 45 ml de BSA) y el mix del cromógeno DAB (720 mg DAB + 3 ml de H₂O₂ al 3% en 600 ml de acetato sódico). Finalmente, todas las secciones se tiñeron con violeta de cresil, se deshidrataron gracias a la sumersión en una batería de alcoholes en graduaciones ascendentes, fueron sumergidas en xileno y posteriormente cubiertas con un medio de montaje hidrofóbico (Permount[®]).

4.5. Contaje celular

Para asegurarse de que se realiza un contaje ciego en todos los recuentos de células positivas para Ki-67, las muestras fueron previamente codificadas y este código no se descubrió hasta que los recuentos fueron analizados. Por tanto, las células inmunoteñidas se contaron con un microscopio óptico Leica DMR dentro del giro dentado enfocando a través del grosor de la sección utilizando un objetivo 63x. Se utilizó el procedimiento estereológico imparcial descrito por García-Fuster et al. (2010) en el que cada octava sección se contó a lo largo de la extensión del hipocampo, y la suma se multiplicó por el factor de muestreo 8 para proporcionar una estimación del número total de células positivas por animal.

4.7. Análisis de los resultados

Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism, versión 8. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos al presentar un nivel de probabilidad igual o inferior a 0,05 y se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). En función de los grupos experimentales a comparar se realizaron ANOVAs de 2 o 3 vías con o sin medidas repetidas seguidas de un test de comparaciones múltiples (Sidak) en caso necesario, y/o comparaciones mediante el test *t* de Student, tal y como se describe para cada resultado particular.

5. RESULTADOS

5.1. Evolución del consumo líquido en dieta y del peso de los animales en experimentación

En este apartado se muestra el volumen líquido total consumido a diario por los diferentes grupos: en el caso del grupo control el volumen se corresponde únicamente a agua, mientras que en el grupo alcohol se refiere a la suma de agua y alcohol. El volumen total medio diario ingerido durante todo el procedimiento por el grupo control fue de $45,1 \pm 9,6$ ml en el caso de las hembras y $44,2 \pm 7,5$ ml de los machos. Por otra parte, en el grupo experimental, la cantidad media ingerida por las hembras fue de $45,0 \pm 11,4$ ml y de $46,9 \pm 7,4$ ml en el caso de los machos. Estos valores se mantuvieron constantes durante el experimento, y no se observaron diferencias en el volumen medio ingerido en la dieta por los diferentes grupos, así como tampoco encontramos diferencias entre sexos en los mismos grupos.

En la [Figura 3](#) se representa la evolución del peso medio (g) de las ratas durante el procedimiento. Se realizó un ANOVA de 3 vías con medidas repetidas, donde las variables independientes eran el tratamiento (etanol o agua), el sexo (macho o hembra) y el día de medida. Los resultados demuestran una ausencia de efecto del tratamiento ($F_{1,38}=1,11$, $p=0,355$), pero un efecto significativo del sexo ($F_{1,38}=281,8$, $p<0,0001$) y del día ($F_{6,228}=323,6$, $p<0,0001$). Estos datos demuestran las diferencias esperadas de peso entre sexos, así como aumento normal del peso con el paso de los días. En concreto, los animales aumentaron progresivamente su peso a lo largo del protocolo. Al inicio del experimento, las hembras del grupo experimental presentaban un peso medio de 223 ± 15 gramos, en el caso de los machos de este mismo grupo era 326 ± 23 gramos, mientras que en el momento del sacrificio era de 262 ± 17 gramos en hembras y 405 ± 26 gramos en machos. Los pesos del grupo control en ambos sexos presentaron valores muy similares a los del grupo experimental, tal como viene expresado en la [Tabla 1](#).

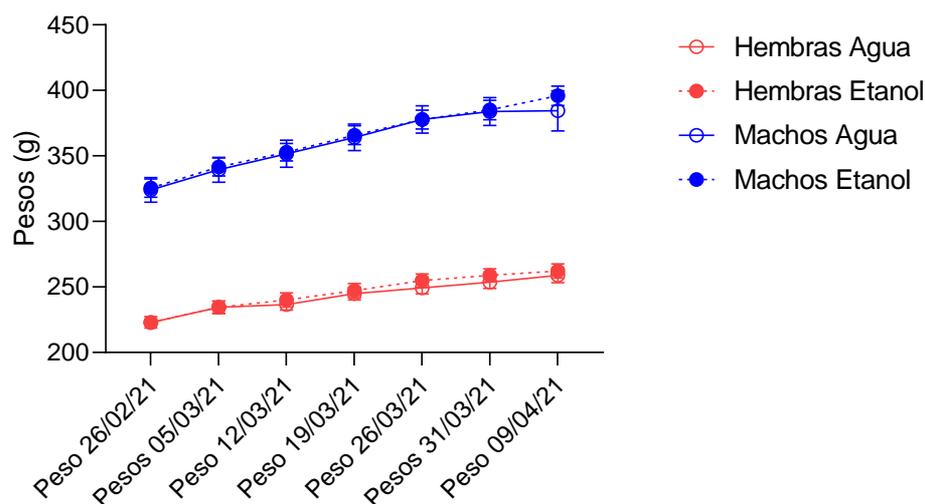


Figura 3 - Evolución del peso medio (g) de las ratas de los distintos grupos a lo largo de todo el procedimiento. Machos agua (n=10), hembras agua (n=10), machos etanol (n=11) y hembras etanol (n=11).

Grupo	Sexo	Inicio procedimiento	Final procedimiento
Control	Hembras	223 ± 11	263 ± 18
	Machos	324 ± 30	403 ± 35
Etanol	Hembras	223 ± 15	262 ± 17
	Machos	326 ± 23	405 ± 26

Tabla 1 - Pesos medios (g) al inicio y al final del experimento de cada uno de los grupos.

5.2 Análisis del consumo voluntario y preferencia de etanol

En la imagen A de la Figura 4, se expresa la media del consumo diario de etanol en gramos frente a la media del agua consumida por ambos sexos en los grupos experimentales durante los días de tratamiento. Se realizó un ANOVA de 3 vías con medidas repetidas, donde las variables independientes eran el consumo (etanol o agua), el sexo (macho o hembra) y el día de medida. Los resultados demuestran un efecto significativo del consumo ($F_{1,38}=4,47$, $p=0,0412$) y del día ($F_{1,98,75,07}=20,48$, $p<0,0001$), pero no del sexo ($F_{1,38}=0,02$, $p=0,8831$). Entre sexos por lo que respecta al consumo diario, tanto hembras como machos consumieron cantidades muy similares tanto de agua como de etanol.

Como hemos visto en el apartado anterior, las hembras presentaban menor peso que los machos, y por este motivo al corregir el consumo de etanol (g) por el peso (kg) observamos una mayor concentración consumida (g/kg) en hembras que en machos. En concreto, en la Imagen B vemos la media de los grupos para la concentración de

etanol consumida expresada en g/kg de rata en los días de tratamiento. El ANOVA de 2 vías (variables independientes: sexo y día) mostró un efecto significativo del sexo ($F_{1,20}=7,82$, $p=0,0112$) y día ($F_{2,4,48}=13,07$, $p<0,0001$), observado como una mayor concentración consumida por parte de las hembras en global. El análisis *post-hoc* de comparaciones múltiples de Sidak solo encontró diferencias significativas al comparar la concentración de etanol consumida entre sexos para el día 13 (+5 g, $**p=0,0011$, Figura 4b). Si evaluamos este mismo parámetro agrupado por las semanas que duró el consumo intermitente (Figura 4c), el ANOVA de 2 vías (variables independientes: sexo y semana) también mostró un efecto significativo del sexo ($F_{1,20}=7,83$, $p=0,0111$) y día ($F_{1,6,31,48}=17,86$, $p<0,0001$). El análisis *post-hoc* de comparaciones múltiples de Sidak encontró diferencias significativas en las semanas 3, 4 y 5 del procedimiento (entre +14 y +17 g, $*p=0,05$, Figura 4c). Además, en esta gráfica se aprecia una tendencia a reducir el consumo de etanol por parte de ambos sexos con el transcurso de las semanas.

En la Figura 4d se representa la preferencia por el consumo expresado como el porcentaje entre el consumo de etanol o agua sobre el volumen total consumido (g etanol + g agua). Se realizó un ANOVA de 3 vías con medidas repetidas, donde las variables independientes eran la preferencia en el consumo (en %), el sexo (macho o hembra) y el día de medida. Los resultados demuestran un efecto significativo de la preferencia en el consumo ($F_{1,360}=690,7$, $p<0,0001$) y del día ($F_{17,360}=19,79$, $p<0,0001$), pero no del sexo ($F_{1,360}=1,64$, $p=0,2005$). Los resultados demuestran una mayor preferencia por agua en comparación con el etanol, y esta mayor preferencia no varía entre sexos, ya que no se encontraron diferencias significativas en este aspecto (el porcentaje de etanol consumido rondaba el 40 % del volumen total consumido para ambos sexos). Esta preferencia se mantiene constante durante todo el procedimiento, no se producen cambios significativos con el paso del tiempo (Figura 4d).

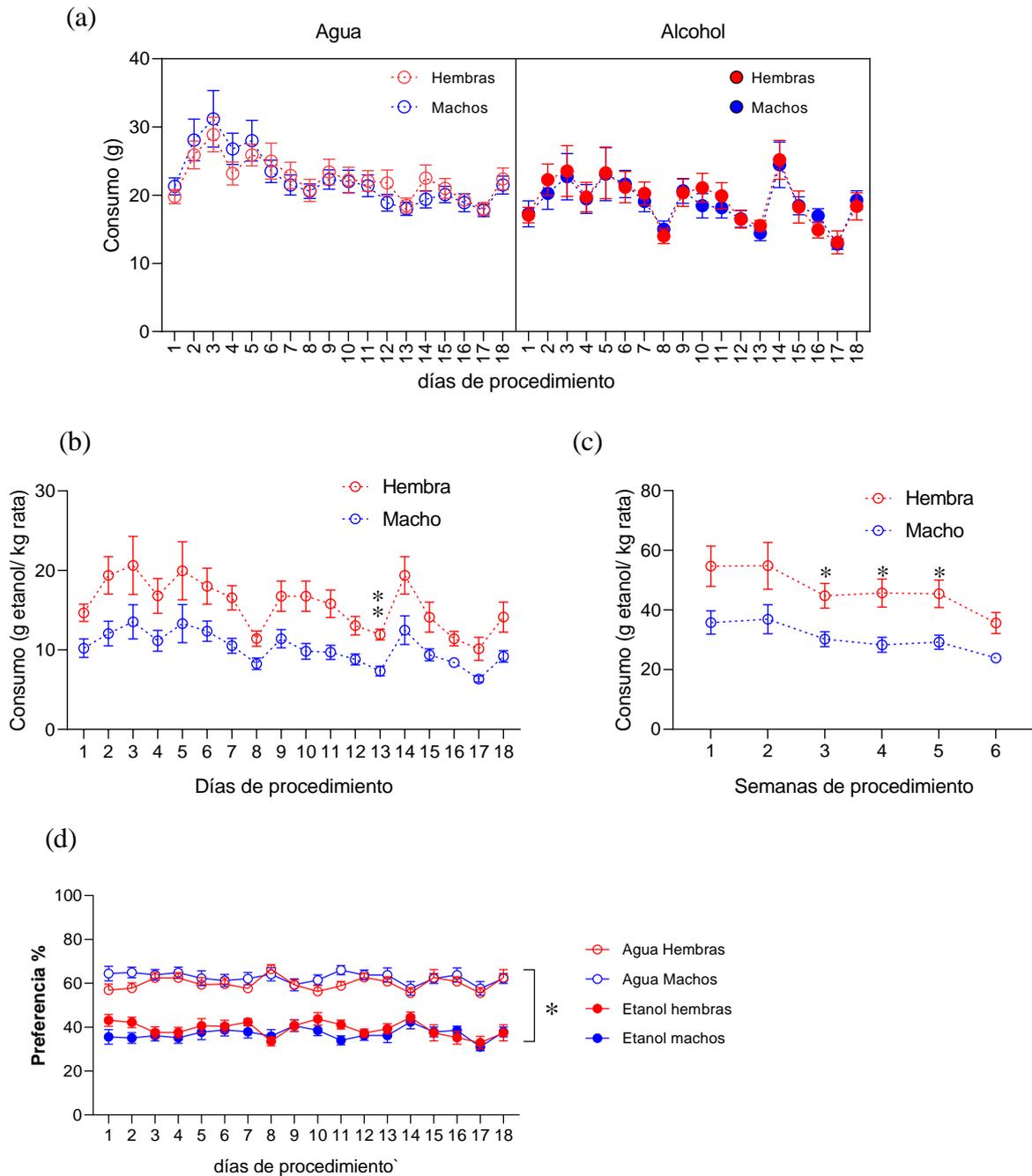


Figura 4 – (a) Comparación del consumo en gramos de agua en el grupo control (media de las dos botellas) y etanol al 20% en ambos sexos mediante el modelo de consumo voluntario intermitente (martes, miércoles y jueves) mediante la elección de dos botellas (etanol vs. agua). (b) Representación de la media de la concentración consumida de alcohol diaria expresado en gramos etanol/kilogramos rata para cada sexo. (c) Representación de la media la concentración consumida de alcohol semanal expresada en gramos etanol/kilogramos rata de cada sexo. (d) Representación de la preferencia diaria (expresada en %) por alcohol frente al agua sobre el volumen total ingerido para ambos sexos.

5.3. Efectos del modelo de consumo voluntario intermitente de etanol sobre la proliferación celular hipocampal

Se estudiaron los posibles efectos neurotóxicos inducidos por el etanol ingerido mediante el modelo de consumo voluntario intermitente sobre la proliferación de células en el giro dentado del hipocampo. Se tomaron como referencia los grupos que solo habían consumido agua, se buscaron posibles consecuencias del consumo de etanol y si estos efectos eran dispares para cada sexo. Se analizaron los resultados mediante un ANOVA de dos vías (variables independientes: consumo (etanol o agua), el sexo) que no mostró efectos significativos de consumo ($F_{1,35}=0,51$, $p=0,4816$) o sexo ($F_{1,35}=1,41$, $p=0,2431$; véase Figura 5a). Sin embargo, al hacer comparaciones entre los grupos que recibieron etanol (machos etanol vs. hembras etanol), el test t de Student de dos colas demostró diferencias significativas ($t=2,747$, $df=18$); las ratas hembra mostraron una disminución significativa en los valores de proliferación con respecto a las ratas macho tratadas con etanol (-96 células Ki-67+, $*p=0,0133$, véase Figura 5b). Además, las ratas hembra tratadas con etanol también mostraron menos células Ki-67 positivas en el hipocampo respecto a sus controles hembra (-80 células Ki-67+, $t=1,927$, $df=18$, $*p=0,0699$, datos no mostrados en las gráficas).

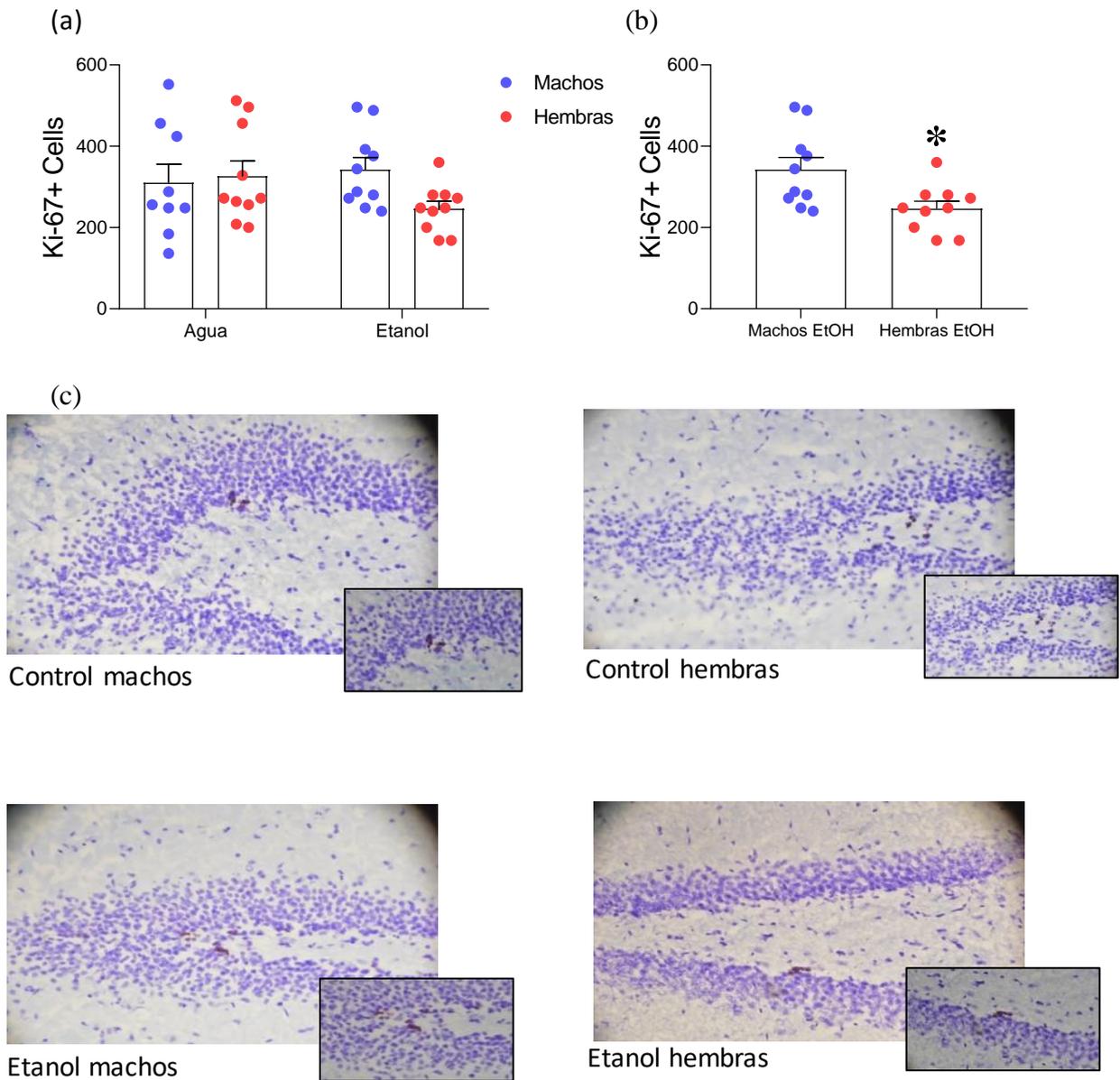


Figura 6 – Representación de los efectos del etanol tras el modelo de consumo voluntario intermitente en ratas macho y hembra sobre los índices de proliferación celular. (a) La gráfica muestra un análisis cuantitativo del número de células Ki67+ donde se pueden comparar los valores de cada grupo y sus respectivos sexos. (b) La gráfica muestra un análisis cuantitativo del número de células Ki67+ donde se observan las diferencias entre los machos y hembras del grupo etanol, siendo estas las que presentan valores reducidos con respecto a sus controles. (c) Imágenes representativas de cada grupo de las células Ki-67+ marcadas en marrón dentro de la capa granular del giro dentado (lila). Imágenes obtenidas con un microscopio óptico utilizando los objetivos de 40x (imagen grande) y 63x (imagen pequeña).

6. DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en el presente estudio realizado en ratas indican que el modelo de consumo voluntario de etanol es un modelo válido por el hecho de que hay un consumo considerable de alcohol, pero no ha servido para observar el incremento progresivo esperado en el consumo o preferencia de etanol con el tiempo. Además, los resultados muestran que las hembras, quienes han consumido una mayor concentración de alcohol (expresada en g/Kg), son también las que sufren un mayor deterioro por el consumo de alcohol en cuanto a los índices de proliferación celular (mayores efectos neurotóxicos). Esto sugiere una posible correlación positiva entre la concentración de alcohol consumida y la neurotoxicidad inducida y observada como una inhibición de la neurogénesis hipocampal

Por lo que respecta a la evolución del peso de los animales, el modelo empleado en este estudio no tiene efectos en el peso de las ratas que consumieron alcohol, ya que se observa la misma progresión entre los grupos experimentales y los controles. Aunque es lógico pensar que el consumo de alcohol implica un aumento en la ingesta calórica de las ratas, y que este se tendría que ver reflejado en un aumento del peso corporal, la bibliografía muestra todo lo contrario. Ratas que consumían alcohol mostraron un descenso en la progresión del peso corporal frente a los grupos control tras 14 días de consumo (Rothwell & Stock, 1984). Ratas que consumieron etanol al 20% durante 18 días de tratamiento tuvieron una menor progresión del peso corporal, ya que el aumento esperado con el tiempo fue significativamente menor que en ratas que consumieron agua y que en aquellas que consumieron alcohol al 10% (Larue-Achagiotis et al., 1990). Las disparidades en los resultados obtenidos seguramente son causa de la diferencia en los modelos de consumo, ya que en el presente estudio no se restringió el agua al grupo experimental, hecho que si ocurre en el modelo empleado por Larue-Achagiotis et al., 1990 y que provoca cierto grado de deshidratación que, junto al incremento del gasto energético empleado en metabolizar el alcohol, causan el descenso de peso corporal. El modelo empleado en el presente estudio no supone un consumo abrupto e inmediato de alcohol por parte de las ratas como es el caso de otros modelos, por lo tanto, es probable que esa sea la causa de que no se vean efectos directos en la progresión del peso de los animales. De todas maneras hay que considerar la posibilidad de que si se alargará el modelo más tiempo podría aparecer esta disminución en el peso de las ratas consumidoras de alcohol. Además, en los dos artículos mencionados, se observaron alteraciones en la cantidad diaria de volumen líquido consumido, disminuyendo este considerablemente en los grupos que consumían alcohol frente a los controles, hecho que tampoco ocurrió en el presente estudio, ya que las ratas del grupo etanol seguían consumiendo agua. El hecho de que no haya diferencias en el volumen líquido ingerido entre los grupos y que el consumo de etanol no fuera excesivo podría explicar por qué no se observaron diferencias en la

progresión del peso de los animales. Nuestros resultados en cuanto a las diferencias de sexos para la evolución del peso concuerdan con los obtenidos por Piano et al., 2005 donde, durante todo el procedimiento, las ratas macho ganaron más peso que dos grupos de hembras, unas ovariectomizadas y otras no. A diferencia de ese estudio, el nuestro tuvo grupos control que no tomaban alcohol para poder comparar la progresión en el peso, y al no haber diferencias en esta progresión con los grupos experimentales, las diferencias entre sexos en la ganancia de peso siguen la tendencia fisiológica y anatómica esperada en roedores, en donde los machos tienen mayor tamaño y por eso su progresión es mayor.

Respecto al consumo de alcohol, en el presente estudio se demuestra que las ratas de esta cepa consumen cantidades considerables de alcohol a diario, indica que el alcohol a esta concentración no es abrasivo para las ratas, pero no se observa la escalada progresiva esperada en el consumo apreciada en otros estudios con esta misma cepa y paradigmas muy similares (Bito-Onon et al., 2011; Li et al., 2011). A pesar de las similitudes en los procedimientos, el paradigma de estos estudios difiere en que las ratas son sometidas a concentraciones ascendentes de etanol, lo que sirve como aclimatación y favorece que los animales se acostumbren más fácilmente al gusto del alcohol. Otra diferencia es que sus procedimientos duran más tiempo, con lo que el periodo en el que las ratas consumen es mayor favoreciendo la aparición del incremento en el consumo. Otro factor que se debe considerar es que el porcentaje de ratas que no muestran una escalada de consumo de alcohol parece ser mayor en la cepa Sprague-Dawley en comparación con otras cepas como las ratas Wistar y Long-Evans (Moorman & Aston-Jones, 2009). Solo cuando se evalúa la concentración consumida (en g/Kg) se observan diferencias entre sexos, ya que las hembras pesan menos para un mismo volumen consumido. Estos resultados encajan con los obtenidos por Piano et al., 2005, donde se observaron diferencias significativas entre sexos en cuanto a la concentración consumida expresada en g/Kg, siendo las hembras las que consumían una mayor concentración con respecto a los machos. Almeida et al., 1998 estableciendo que las mayores cantidades de etanol ingeridas por las hembras tenían una correlación de comportamiento en la medida en que las ratas hembra mostraban puntuaciones de preferencia de etanol considerablemente más altas en presencia de otro líquido para beber (agua) y sin privación de comida. En nuestro caso, esta correlación no se observa, ya que las hembras no presentan puntuaciones de preferencia más altas, de hecho, se mantienen constantes e iguales a las de los machos. A pesar de que la concentración de etanol empleada no ha tenido un gusto abrasivo para las ratas, ya que sino el consumo no se mantendría constante, sino que iría descendiendo con los días de exposición, es posible que sea una concentración relativamente alta como para que se produzca la escalada deseada. En la mayoría de la bibliografía revisada ya mencionada, la concentración o era más baja o iba aumentando progresivamente, por tanto, diferencias en los métodos utilizados para

evaluar la ingesta de etanol puede resultar en diferentes puntos de vista sobre cómo las diferencias sexuales influyen en los patrones de ingesta de etanol.

Mediante el estudio inmunohistoquímico se quiso evaluar el índice de proliferación celular asociado a la neurogénesis hipocampal. El modelo de consumo con acceso intermitente voluntario demostró tener mayores efectos sobre las hembras, ya que solo en ellas disminuye el índice de proliferación celular tras el consumo de etanol (vs. el grupo control hembra pero también vs. el grupo etanol macho), fenómeno que no ocurre en los machos del presente estudio (sin diferencias observadas al compararlo con el grupo control macho). Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos por Maynard et al., 2018 donde encontraron una disminución significativa inducida por atracones de alcohol en las neuronas granulares del giro dentado en ratas hembra, sin embargo, no encontraron esta disminución significativa en machos. A diferencia del presente estudio, en los machos también se redujo el número de células en proliferación, situación que no se observa en los machos de este estudio. Podemos afirmar que hay un efecto principal de sexo en el número de células Ki67+, ya que los resultados demuestran que los niveles de proliferación celular en hembras se ven afectados en mayor grado que en los machos, que combinado con que en mujeres también se han encontrado índices de muerte celular por consumo excesivo de alcohol (Maynard et al., 2018) contribuyen considerablemente a la vulnerabilidad del sexo femenino en los fenómenos de neurotoxicidad hipocampal tras el abuso del alcohol. Este mismo estudio, demostró que el descenso de neuronas granulares está asociado con alteraciones de la navegación espacial, así como a una disminución de la expresión de las moléculas de soporte tróficas, como el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Maynard et al., 2018). Es muy importante considerar que la degeneración neuronal inducida por alcohol ocurre principalmente durante la intoxicación y está relacionada con un aumento del estrés oxidativo y proteínas proinflamatoria, causando neurotoxicidad. La abstinencia después del atracón por etanol da como resultado la génesis de las células cerebrales que podría contribuir al retorno de la función y estructura del cerebro que se encuentran en los humanos abstinentes (Crews & Nixon, 2009). Más evidencias de esta reversibilidad la aportan estudios como (Nixon & Crews, 2004; Broadwater et al., 2014) en donde los roedores adultos expuestos al consumo abusivo de alcohol y que muestran una pérdida transitoria de la neurogénesis hipocampal, esta se recupera después de un período de abstinencia prolongado (30 días).

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de este estudio son:

1. El modelo de consumo voluntario de etanol mediante la elección de dos botellas en rata adulta empleado en el presente estudio ha servido para demostrar que las ratas hembra consumen una concentración mayor de alcohol que las macho. Sin embargo, el modelo no ha producido la esperada escalada gradual del consumo moderado a excesivo de etanol que de alguna manera mimetiza la transición del consumo moderado de tipo "social" al consumo excesivo de alcohol en los seres humanos y desencadena en el desarrollo de adicción. Las adaptaciones metodológicas revisadas en la bibliografía podrían servir para conseguir este objetivo y establecer el modelo como válido para este cometido.
2. La evaluación de la proliferación celular en el hipocampo adulto con el marcador endógeno Ki.67 nos ha manifestado la presencia de diferencias entre sexos en la vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos del consumo excesivo de alcohol, siendo las ratas hembra mucho más vulnerables que los machos en cuanto a sufrir una inhibición de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo.
3. A pesar de no encontrar una correlación estadísticamente válida entre los resultados conductuales y los neuroquímicos, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren una relación proporcional entre la concentración de alcohol consumida y la inhibición de la proliferación celular, ya que las ratas que más alcohol han consumido son las que tienen menor número de neuronas en proliferación.

En los próximos estudios se mejorará el modelo para poder observar la escalada progresiva deseada y, además, evaluar más marcadores de plasticidad neuronal que comprendan distintas etapas de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, así como otros marcadores de neurotoxicidad. Esto permitirá encontrar y estudiar más diferencias sexuales en la vulnerabilidad frente al desarrollo de adicciones y con ello apoyar la investigación relacionada con el alcoholismo, con la posibilidad de crear tratamientos farmacológicos personalizados que ayuden a la sociedad a combatir los trastornos asociados al consumo de alcohol.

8. AGRADECIMIENTOS

Los estudios incluidos en este trabajo de fin de máster se han financiado por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, y forma parte del proyecto 2020/001 (``Consecuencias conductuales y neuroquímicas del consumo combinado de alcohol y cocaína en la adolescencia en ratas macho y hembra: tratamiento farmacológico´´), cuya investigadora principal es la Dra. M^a Julia García Fuster.

También me gustaría agradecer a todos los miembros del grupo de investigación de Neurofarmacología, empezando por la Dra M^a Julia García Fuster, por brindarme la oportunidad y la confianza para realizar el presente estudio, y por supuesto al resto de compañeros Cristian Bis, Sandra Ledesma y Elena Hernández por su ayuda desinteresada, imprescindible para la realización de este Trabajo de Fin de Máster.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albanese, A. P. (2012). Management of Alcohol Abuse. In *Clinics in Liver Disease* (Vol. 16, Issue 4, pp. 737–762). <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.006>
- Almeida, O. F. X., Shoaib, M., Deicke, J., Fischer, D., Darwish, M. H., & Patchev, V. K. (1998). Sex Differences in Ethanol Preference. *J. Clin. Invest*, *101*(12), 2677–2685. <http://www.jci.org>
- Bayard, M., McIntyre, J., Hill, K. R., & Woodside, J. (2004). Alcohol withdrawal syndrome. *American Family Physician*, *69*(6), 1443–1450. www.aafp.org/afp
- Becker, J. B., & Chartoff, E. (2019). Sex differences in neural mechanisms mediating reward and addiction. *Neuropsychopharmacology*, *44*(1), 166–183. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0125-6>
- Bienkowski, P., Kuca, P., Piasecki, J., & Kostowski, W. (1996). Low dose of ethanol induces conditioned place preference in rats after repeated exposures to ethanol or saline injections. *Alcohol and Alcoholism*, *31*(6), 547–553. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008190>
- Bito-Onon, J. J., Simms, J. A., Chatterjee, S., Holgate, J., & Bartlett, S. E. (2011). Varenicline, a partial agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors, reduces nicotine-induced increases in 20% ethanol operant self-administration in Sprague-Dawley rats. *Addiction Biology*, *16*(3), 440–449. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2010.00309.x>
- Broadwater, M. A., Liu, W., Crews, F. T., & Spear, L. P. (2014). Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Developmental Neuroscience*, *36*(3–4), 297–305. <https://doi.org/10.1159/000362874>
- Canales, J. J. (2007). Adult neurogenesis and the memories of drug addiction. In *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* (Vol. 257, Issue 5, pp. 261–270). <https://doi.org/10.1007/s00406-007-0730-6>
- Carnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. In *Alcohol* (Vol. 48, Issue 3, pp. 243–252). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>
- Chambers, R. A., Potenza, M. N., Hoffman, R. E., & Miranker, W. (2004). Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology*, *29*(4), 747–758. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300358>
- Chang, P. H., & Steinberg, M. B. (2001). Alcohol withdrawal. *Medical Clinics of North America*, *85*(5), 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70372-2](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70372-2)
- Charness, M. E. (1993). Brain Lesions in Alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *17*(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1993.tb00718.x>

- Crabbe, J. C., Harris, R. A., & Koob, G. F. (2011). Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1216*(1), 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05895.x>
- Crews, F. T., & Nixon, K. (2009). Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. In *Alcohol and Alcoholism* (Vol. 44, Issue 2, pp. 115–127). Alcohol Alcohol. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn079>
- Crews, F. T., Nixon, K., & Wilkie, M. E. (2004). Exercise reverses ethanol inhibition of neural stem cell proliferation. *Alcohol*, *33*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.04.005>
- De La Monte, S. M., & Kril, J. J. (2014). Human alcohol-related neuropathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 127, Issue 1, pp. 71–90). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1233-3>
- Denny, L., Coles, S., & Blitz, R. (2017). *Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders*. *96*(8). www.aafp.org/afp
- Fernando Valenzuela, C. (1997). Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Research and Health*, *21*(2), 144–148. [/pmc/articles/PMC6826822/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)
- García-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *European Journal of Neuroscience*, *31*(1), 79–89. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07045.x>
- Goodlett, C. R., Horn, K. H., & Zhou, F. C. (2005). Alcohol teratogenesis: Mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental Biology and Medicine*, *230*(6), 394–406. <https://doi.org/10.1177/15353702-0323006-07>
- Grace, A. A. (2000). The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*, *95*(8s2), 119–128. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.95.8s2.1.x>
- Hietala, J., West, C., Syvälahti, E., Någren, K., Lehtikainen, P., Sonninen, P., & Ruotsalainen, U. (1994). Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology*, *116*(3), 285–290. <https://doi.org/10.1007/BF02245330>
- Koob, G. F., Roberts, A. J., Schulteis, G., Parsons, L. H., Heyser, C. J., Hyytiä, P., Merlo-Pich, E., & Weiss, F. (1998). Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *22*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb03611.x>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 217–238). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Larue-Achagiotis, C., Poussard, A. M., & Louis-Sylvestre, J. (1990). Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiology and Behavior*, *47*(3), 545–548. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90124-M](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90124-M)

- Li, J., Zou, Y., & Ye, J. H. (2011). Low frequency electroacupuncture selectively decreases voluntarily ethanol intake in rats. *Brain Research Bulletin*, 86(5–6), 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.08.013>
- Liang, J., & Olsen, R. W. (2014). Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: The role of GABAA receptors. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 35, Issue 8, pp. 981–993). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.50>
- Lømø, T. (2018). Discovering long-term potentiation (LTP) – recollections and reflections on what came after. In *Acta Physiologica* (Vol. 222, Issue 2). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/apha.12921>
- Lovinger, D. M. (2008). Communication networks in the brain: Neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. In *Alcohol Research and Health* (Vol. 31, Issue 3, pp. 196–214). National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. [/pmc/articles/PMC3860493/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1960493/)
- Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R., & Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: A functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science*, 333(6040), 353–357. <https://doi.org/10.1126/science.1204622>
- Luu, P., Sill, O. C., Gao, L., Becker, S., Wojtowicz, J. M., & Smith, D. M. (2012). The role of adult hippocampal neurogenesis in reducing interference. *Behavioral Neuroscience*, 126(3), 381–391. <https://doi.org/10.1037/a0028252>
- Mandyam, C. D., & Koob, G. F. (2012). The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends in Neurosciences*, 35(4), 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.TINS.2011.12.005>
- Martín Bustos, M. (2008). Núcleo accumbens y el sistema motivacional a cargo del apego. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 46(3), 207–215. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272008000300006>
- Maynard, M. E., Barton, E. A., Robinson, C. R., Wooden, J. I., & Leasure, J. L. (2018). Sex differences in hippocampal damage, cognitive impairment, and trophic factor expression in an animal model of an alcohol use disorder. *Brain Structure and Function*, 223(1), 195–210. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1482-3>
- Ministerio De Sanidad.(2020) *Boletín Oficial Del Estado*, 61561–61567.
- Moorman, D. E., & Aston-Jones, G. (2009). Orexin-1 receptor antagonism decreases ethanol consumption and preference selectively in high-ethanol-preferring Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 43(5), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.07.002>
- Morris, S. A., Eaves, D. W., Smith, A. R., & Nixon, K. (2010). Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*, 20(5), 596–607. <https://doi.org/10.1002/hipo.20665>

- Nakamura, N., Yamamoto, H., Yao, T., Oda, Y., Nishiyama, K. I., Imamura, M., Yamada, T., Nawata, H., & Tsuneyoshi, M. (2005). Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Human Pathology*, 36(7), 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.03.012>
- Nixon, K., & Crews, F. T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 83(5), 1087–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01214.x>
- Nixon, K., & Crews, F. T. (2004). Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *Journal of Neuroscience*, 24(43), 9714–9722. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3063-04.2004>
- Nunes, P. T., Kipp, B. T., Reitz, N. L., & Savage, L. M. (2019). Aging with alcohol-related brain damage: Critical brain circuits associated with cognitive dysfunction. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 148, pp. 101–168). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.09.002>
- Opitz, B. (2014). Memory function and the hippocampus. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 51–59). Front Neurol Neurosci. <https://doi.org/10.1159/000356422>
- Pereira, R. B., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2015). A Comprehensive View of the Neurotoxicity Mechanisms of Cocaine and Ethanol. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 28, Issue 3, pp. 253–267). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9536-x>
- Piano, M. R., Carrigan, T. M., & Schwertz, D. W. (2005). Sex differences in ethanol liquid diet consumption in Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 35(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.002>
- Quigley, J. A., Logsdon, M. K., Turner, C. A., Gonzalez, I. L., Leonardo, N. B., & Becker, J. B. (2021). Sex differences in vulnerability to addiction. *Neuropharmacology*, 187(January), 108491. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108491>
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2003). Addiction. In *Annual Review of Psychology* (Vol. 54, pp. 25–53). <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.54.101601.145237>
- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1984). Influence of alcohol and sucrose consumption on energy balance and brown fat activity in the rat. *Metabolism*, 33(8), 768–771. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(84\)90220-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(84)90220-8)
- Ryder, M. I., Couch, E. T., & Chaffee, B. W. (2018). Personalized periodontal treatment for the tobacco- and alcohol-using patient. In *Periodontology 2000* (Vol. 78, Issue 1, pp. 30–46). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/prd.12229>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)

- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long–Evans and Wistar Rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2008.00753.X>
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. In *Chromosoma* (Vol. 127, Issue 2, pp. 175–186). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Sutherland, R. J., & Rudy, J. W. (1989). Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology*, 17(2), 129–144. <https://doi.org/10.3758/BF03337828>
- Thomas, M. B., & Becker, J. B. (2019). Sex differences in prenatal stress effects on cocaine pursuit in rats. *Physiology and Behavior*, 203, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.019>
- Van Haaren, F., & Meyer, M. E. (1991). Sex differences in locomotor activity after acute and chronic cocaine administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 39(4), 923–927. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90054-6)
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. In *Neuropharmacology* (Vol. 56, Issue SUPPL. 1, pp. 3–8). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- Volkow, Nora D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Logan, J., Hitzemann, R., Ding, Y. S., Pappas, N., Shea, C., & Piscani, K. (1996). Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(9), 1594–1598. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb05936.x>
- White, A. M. (2003). What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27(2), 186–196. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6668891/>
- World Health Organisation. (2018). Global status report on alcohol and health. *World Health Organization*, 122(December 1994), 1–85. <http://apps.who.int/bookorders>.