



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE GRAU

**NEUROTOXICITAT DE L'ETANOL DURANT
L'ADOLESCÈNCIA PRIMERENCA EN RATES
MASCLE I FEMELLA**

Antonio Rafael Calahorro Bover

Grau de: Bioquímica

Facultat de: Ciències

Any acadèmic 2021-22

NEUROTOXICITAT DE L'ETANOL DURANT L'ADOLESCÈNCIA PRIMERENCA EN RATES MASCLE I FEMELLA

Antonio Rafael Calahorro Bover

Treball de Fi de Grau

Facultat de: Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any acadèmic 2021-22

Paraules clau del treball:

Etanol, neurotoxicitat, models animals

Nom del tutor / la tutora del treball: M. Julia García Fuster

Nom del tutor / la tutora (si escau)

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resum

L'alcohol és una substància psicoactiva d'ús molt estès en la nostra societat, especialment en la població jove. Aquest afecta especialment al cervell interferint en les vies d'inhibició i excitació, i alterant l'expressió de gens de proliferació neuronal. Dites alteracions poden afectar de manera diferent de manera sexe-depenent, podent existir diferències en la taxa de metabolització entre sexes. La seva toma en una etapa d'alta plasticitat neuronal, com és l'adolescència, en patrons d'ús intermitent (patró comú en dit període d'edat) s'associa a deterior cognitiu, a més de predisposar a conductes proaddictives. En el present treball s'estudia l'efecte de l'administració aguda d'etanol (3 g/kg) en rates *Sprague-Dawley* sobre els nivells de proliferació neuronal hipocampal, i les diferències entre mascles i femelles. A partir dels resultats d'una immunohistoquímica basada en l'ús del marcador endogen Ki-67, no s'observaren diferències significatives en l'índex de proliferació neuronal ni pel tractament ni pel sexe. Addicionalment els resultats de les concentracions plasmàtiques d'etanol en sang mostraren les diferències esperades amb el temps, però no mostraren diferències en la taxa de metabolització entre sexes, una vegada corregit pel pes i per la quantitat eliminada. Aquests resultats, obrin una finestra per pròxims estudis relacionats amb l'inici primerenc de toma d'alcohol i els seus efectes, amb la gran afectació social que aquest comporta.

Resumen

El alcohol es una sustancia psicoactiva de uso muy extendido en nuestra sociedad, especialmente en la población joven. Este afecta especialmente al cerebro interfiriendo en las vías de inhibición y excitación, y alterando la expresión de genes de proliferación neuronal. Dichas alteraciones pueden afectar de diferente modo en función del sexo, pudiendo existir diferencias en la tasa de metabolización entre sexos. Su toma en una edad de alta plasticidad neuronal, como es la adolescencia, en patrones de uso intermitente (patrón común en dicho período de edad) se asocia a deterioro cognitivo, además de predisponer a conductas proadictivas. En el presente trabajo se estudia el efecto de la administración aguda de etanol (3 g/Kg) en ratas *Sprague-Dawley* sobre los niveles de proliferación neuronal hipocampal, y las diferencias entre machos y hembras. A partir de los resultados de una inmunohistoquímica basada en el uso del marcador endógeno Ki-67, no se observaron diferencias en el índice de proliferación neuronal ni por el tratamiento ni por el sexo. Adicionalmente, los resultados de las concentraciones plasmáticas de etanol en sangre mostraron las diferencias esperadas con el tiempo, pero no mostraron diferencias en la tasa de metabolización entre sexos, una vez corregida por el peso y la cantidad eliminada. Estos resultados abren una ventana para

próximos estudios relacionados con el inicio temprano de toma de alcohol y sus efectos, con la gran afectación social que este conlleva.

Abstract

Alcohol is a widely used psychoactive substance in our society, especially in young people. This especially affects the brain by interfering with the inhibition and excitation pathways and altering the expression of neuronal proliferation genes. Such alterations may be affected in a sex-dependent way, and there may be differences in the rate of metabolism between sexes. Alcohol intake in a stage of high neuronal plasticity, such as adolescence, in patterns of intermittent use (a common pattern in this period) is associated with cognitive impairment, as well as increased propensity to proaddictive behaviors. The present study investigates the effect of acute ethanol administration (3 g/Kg) on *Sprague-Dawley* rats on the basal rate of neuronal proliferation in the hippocampus, and the differences between males and females. Based on the results of an immunohistochemistry using the endogenous marker Ki-67, no significant differences induced by treatment or sex were observed in the rate of neuronal proliferation. In addition, the results of plasma ethanol concentrations in blood showed the expected differences with time, but did not show differences in the rate of metabolism between sexes, once corrected by weight and the amount of ethanol eliminated. These results may open new doors for future studies related to the early onset of alcohol use and its effects, with the huge social impact that this entails.

Índex

1. Introducció.....	6
1.1. Alcohol i la seva afectació social: edat d'inici i sexe	6
1.2. Neurotoxicitat induïda per l'etanol: edat i sexe	7
1.3. Disminució de la neurogènesi hipocampal com exemple de neurotoxicitat induïda per l'etanol: edat i sexe	10
1.3.1. <i>Canvis neurogènics i morfològics durant l'adolescència</i>	10
1.3.2. <i>Efectes de l'etanol en la neurogènesi hipocampal: edat i sexe</i>	12
2. Objectius	15
3. Materials i mètodes	16
3.1. Animals d'experimentació	16
3.2. Disseny experimental: tractament farmacològic, recollida de sang i de mostres cerebrals.....	16
3.3. Quantificació dels nivells d'etanol en sang	17
3.4. Obtenció dels talls histològics de la regió hipocampal	18
3.5. Immunohistoquímica	19
3.6. Comptatge de les cèl·lules Ki-67+.....	20
3.7. Anàlisi de dades.....	20
4. Resultats	22
4.1. Diferències farmacocinètiques de l'etanol entre sexes	22
4.2. Regulació de la primera etapa de la neurogènesi hipocampal en base a l'administració aguda d'etanol en rates mascles i femelles adolescents	23
5. Discussió.....	26
6. Conclusions.....	29
7. Agraïments.....	30
8. Bibliografia	31

1. Introducció

1.1. Alcohol i la seva afectació social: edat d'inici i sexe

L'etanol és una molècula petita, de característiques lipofíliques i de ràpida difusió i distribució dins l'organisme. Tot i que els seus usos estan molt distribuïts dintre de l'ús habitual (com l'ús desinfectant durant la crisi de la COVID), la raó majoritària per la que ens resulta familiar és per estar present en begudes fermentades i destil·lades. Això és degut a la seva capacitat psicoactiva i desinhibitòria.

Aquesta substància és una de les drogues d'abús més emprades a nivell mundial degut a la seva fàcil adquisició. Segons la Organització Mundial de la Salut és un factor causal de més de 200 malalties i trastorns, i causa un 5,3% de les morts a nivell mundial. La seva utilització està prou diversificada en totes les edats i sexes. Això queda plasmat en el informe del Pla Nacional de Drogues del Ministeri de Salut d'Espanya del 2021¹. Algunes dades a remarcar és veure les diferències que hi ha entre la toma puntual d'alcohol i la toma diària entre homes i dones. Mentre que si s'analitzen les dades a llarg períodes, com per exemple el consum en el darrer any, en general les dades són més o manco similars (82,7% pels homes i 71,6% en dones), mentre que en el ús diari, la proporció d'homes que consumeixen (14,2%) quadrupliquen a la proporció de dones (3,4%) .

Seguint amb la anàlisi del document, és també interessant destacar que el consum d'alcohol s'inicia de manera primerenca en l'adolescència. En particular, els homes tenen una edat d'inici en la presa d'alcohol (16,2 anys) inferior a les dones (17,2 anys). Això se relaciona també amb el número de intoxicacions etíliques que es donen. El rang d'edat dels 15 als 24 anys és en el que major número d'intoxicacions etíliques es donen, i són concretament els homes qui encapçalen el major percentatge de intoxicacions, ja no només dins el rang d'edat descrit, sinó dintre del rang d'edat general (15-64 anys). Això se deu al fet de que també és en homes on s'estén més un ús intensiu d'alcohol (també denominat consum en afartament, o "*binge drinking*").

Respecte als aspectes acadèmics, pareix ser cert que les intoxicacions etíliques es donen en major grau en persones amb estudis educatius més alts (secundaris i universitaris), que no en persones sense estudis primaris. És important aquí també dir, que pel contrari, que la presa diària és major en persones sense estudis primaris que no en individus amb estudis superiors, mentre que en la presa general (p.ex.: una vegada al mes), les proporcions s'inverteixen. Això exemplifica que les intoxicacions etíliques tenen major impacte en individus que no són bevedors assidus, és a dir, persones que prenen alcohol en ocasions específiques. La resistència de presa crònica d'alcohol a les intoxicacions etíliques, tot i aquesta estar

relacionada amb moltes altres patologies, com la cirrosi i la pancreatitis², s'associa al fet del desenvolupament de tolerància per aquesta.

Socialment aquesta prevalença de la presa d'alcohol és percebuda de distintes maneres. La majoritària entre els adolescents és la creença de que anima les festes i les fa més divertides, però va seguida del fet de que els hi agrada com se senten i el fer-ho per sentir-se inclosos. Això es relaciona amb els efectes desinhibitoris de l'alcohol i la prevalença d'estats ansiosos durant etapes primerenques, de manera que en molts casos és emprat com a eina social. Ara bé, és molt impactant veure la desinformació que existeix entre els joves (15-17 anys), que curiosament també es veu reflectida en els més ancians (55-64 anys). Quasi un 25% dels homes joves consumeixen alcohol perquè creuen que és saludable i que aquest forma part d'una alimentació equilibrada.

La seva normalització ha derivat en un ús freqüent, quasi diari en alguns casos que pot portar a l'addicció (per diferents mecanismes neuronals que es comentaran posteriorment en el present treball) i causar dependència. Això és degut a les sensacions sedants i eufòriques que provoca en un grup poblacional com són els adolescents, que estan hipersensibilitzats a aquesta mena d'experiències. Més enllà, aquesta presa constant pot acabar causant tolerància que impulsa a l'individu a cercar l'ús combinat amb altra mena de drogues (amb potencials addictius més potents i tot), especialment estimulants, cannabinoids i/o inclús opioids. Tots aquests comportaments no són només capaços de desembocar en fenotips pro-addictius, coneguts com desordres en l'ús d'alcohol (*AUD*), sinó també en conductes de major risc. En relació a aquest darrer concepte, una altra via per la que queda reflectida l'impacte social té a veure amb les alteracions de la percepció i anímiques. Podem destacar entre els joves (14-18 anys) la participació en accidents automobilístics (fins a un 30% en joves de 18 anys) i en baralles (16,9%). Aquestes dades també afecten a les relacions interpersonals, tant en la família (més del 40% tenen discussions familiars), escolar (al voltant d'un 10% sofreixen assetjament) com sexual (més del 10% tenen relacions de les que es penedeixen).

1.2. Neurotoxicitat induïda per l'etanol: edat i sexe

L'etanol és ràpidament absorbible per difusió passiva de manera principal en el duodè. Llavors passa al fetge on serà substrat de biotransformacions. Per una part serà substrat de la alcohol deshidrogenasa, que el convertirà en acetaldèhid, un metabòlit que es considera fins 20 vegades més tòxic. Posteriorment per l'aldehid deshidrogenasa serà convertit en acetat³. Per altra part serà substrat del sistema microsomal (citocrom P450). A nivell metabòlic la primera reacció de biotransformació emprada com a cofactor el NAD^+ , lo que implicarà un dèficit d'aquest

per a altres reaccions. Conseqüentment implicarà un canvi metabòlic cap a la producció de lactat i cossos cetònics, que avocaran cap a una acidosi.

Segons la dosi administrada i la capacitat metabolitzant, arribarà fàcilment a la barrera hematoencefàlica, que travessa i arriba ràpidament a l'encèfal, on l'etanol primàriament actua sobre el sistema GABA-èrgic, principal sistema inhibitori en el sistema mesolímbic. Actua com agonista de l'àcid γ -aminobutíric sobre receptors GABA_A⁴. Pel cas contrari actua com antagonista dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA) de glutamat, que és el principal neurotransmissor excitatori, i està implicat en la plasticitat neuronal de l'aprenentatge, memòria i motivació^{5,6}. Tot això contribueix a l'efecte desinhibitori i sedant, i a l'augment de la eufòria i la sociabilitat de l'individu⁷.

De manera prou interessant, durant l'adolescència hi ha un pic d'activació de les projeccions mesolímbiques dopaminèrgiques cap a zones específiques com el nucli accumbens i l'amígdala. De manera que el rati d'inhibició a excitació és menor durant l'adolescència que no en la adultesa⁸, lo qual s'atribueix a l'estimulació de receptors del tipus GABA_A⁹ en regions frontals. Això conjuntament amb un increment de la hipersensibilitat a les recompenses, acaba causant un increment per la recerca d'experiències noves i de conductes de risc¹⁰. Aquestes conductes seran decisives degut a que l'adolescència esdevé una transició mitjançant la qual permetrà la separació parental del individu¹¹. Això, en el cas de la presa d'alcohol, provoca una sensibilitat encara més incrementada d'activació mitjançada per receptors GABA_A en comparació als adults. En conseqüència, pareix interrompre l'aprenentatge i la memòria, i es postula com a possible causa de la major sensibilitat als buits en la memòria causada per la presa d'alcohol¹².

Una vegada que l'etanol interacciona amb els receptors GABA_A, es desemboca una via de senyalització que provoca l'entrada de clor i la sortida de potassi, disminuint l'excitabilitat¹³. Aquests processos propiciaran l'alliberació de dopamina al espai intersinàptic, que al interaccionar amb els receptors D1 i D2 (receptors acoblats a proteïnes G) donarà una cascada de segons missatgers que acabaran modulant l'expressió gènica de proteïnes d'activitat neuronal¹⁴ (com p. ex. c-Fos). El sistema mesolímbic consta de neurones que s'estenen des de l'àrea tegmental-ventral del mesencèfal fins al nucli accumbens (part del cos estriat ventral), a més d'estar íntimament relacionat amb altres zones cerebrals com el còrtex prefrontal i l'hipocamp (veure Figura 1). D'aquesta manera té una gran importància com a via de motivació i recompensa, que se veu altament potenciada amb l'aplicació de drogues d'abús¹⁵.

Altres dianes d'acció de l'etanol tenen a veure amb dany cerebral degut a neuroinflamació. L'etanol activa el sistema immune mitjançant la interacció amb el *Toll-like* receptor 4 (TLR4)

de les cèl·lules gials: lo que porta a un perfil de secreció de mediadors (iNOS i COX2) i citocines (IL-1 β i IL-6) proinflamatòries¹⁶, que augmenten l'activitat de la caspasa-3 en zones específiques del cervell, i s'associa a una major taxa de neurodegeneració derivada del ús d'alcohol.

Per altre part, l'hipocamp constitueix la regió principal per la memòria episòdica i a llarg terme^{17,18}. A més contribueix a comportaments relacionats amb l'obtenció de recompenses i conductes motivades. La relació entre la memòria i el plaer d'aquesta zona en particular pareix indicar que en l'aplicació de plaer, les memòries episòdiques augmenten¹⁹. Gràcies a aquest fet se concep com a una zona d'alta plasticitat neuronal i per tant una zona en la que es dona un alta taxa proliferativa (neurogènica, veure més endavant la definició del procés).

L'etanol indueix tota una sèrie d'alteracions en el desenvolupament neuronal, especialment en l'època adolescent. Els canvis majoritaris tenen a veure amb una accelerada taxa de disminució del volum de matèria grisa i un menor volum i integritat de la matèria blanca²⁰. La interrupció del desenvolupament causa un volum del còrtex prefrontal disminuïda, que causa una reducció de receptors D1, lo que suggereix que l'excitabilitat augmentada que es dona durant l'adolescència roman en etapes adultes posteriors²¹. Això donaria un fenotip adolescent conservat en edats adultes²².

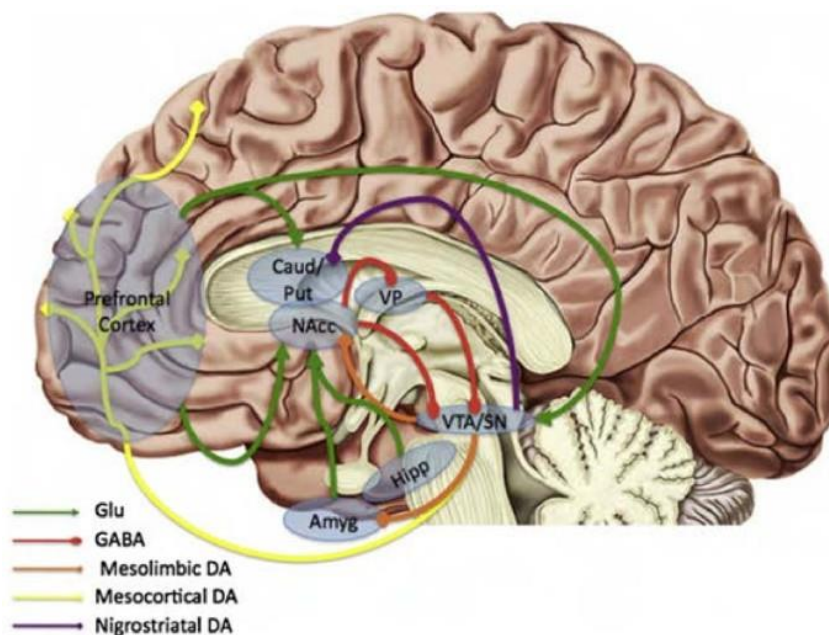


Figura 1. Il·lustració de les vies i circuits reguladors de l'alliberació de dopamina, altament relacionat amb l'experimentació de plaer, memòria i motivació. Especial interès en les vies glutamatèrgiques (verd) i GABA-èrgiques (vermell), entre les àrees ventral-tegmental (VTA), nucli accumbens (NAcc), còrtex prefrontal, amígdala (Amyg) i l'hipocamp (Hipp). També veiem les vies mesolímbica, mesocortical i nigroestriatal, relacionades amb l'alliberació de dopamina. Imatge presa de Dichter i col·laboradors (2012)¹⁴.

Pel que fa al sexe, hem de partir del punt de que les femelles tenen, en general una menor talla i per tant, un menor volum de distribució. Això suposa que per una mateixa dosi, l'efecte sobre dones sol ser més potent que en homes. Addicionalment, hem de valorar l'efecte de les hormones sexuals femenines. S'ha vist en tot un seguit de malalties relacionades amb la neuroinflamació (com esclerosi múltiple i demència²³) són més prevalents en dones, per lo que pareix existir un dimorfisme sexual en aquest aspecte, possiblement relacionat amb l'efecte de les hormones femenines, en especial l'estradiol²⁴. Aquest pareix tenir un efecte neuroprotector al disminuir el dany oxidatiu causat per l'estrès^{24,25}. Ara bé, en gran mesura les malalties neurodegeneratives solen aparèixer en edats avançades, en el cas de la dona post-menopausa, el que, amb la baixada d'estrògens, és el causant de dita prevalença. Tot i així, en etapes adolescents es veu que l'etanol causa una disminució d'àrees cerebrals (com el còrtex prefrontal) en femelles, lo que s'associa també amb el fet de que mentre en mascles augmenta l'activitat social, en femelles causa un augment de l'ansietat social¹¹. Això pot suposar vies diferents de resposta a hormones estressants com la corticosterona (conjuntament amb l'etanol) entre mascles i femelles, donant una inducció diferencial de citoquines²⁶.

En tot aquests processos són importants els patrons d'ingesta de substància. Entre els joves és més comú veure un comportament basat en administracions intermitents d'altres dosis, seguides de períodes d'abstinència. En estudis previs s'ha vist que no només l'efecte de l'etanol per se és el que causa aquests efectes neurotòxics, sinó també els períodes d'abstinència, que pareixen tenir, de per si mateixos, major pes sobre la neurobiologia alterada²⁷.

1.3. Disminució de la neurogènesi hipocampal com exemple de neurotoxicitat induïda per l'etanol: edat i sexe

1.3.1. *Canvis neurogènics i morfològics durant l'adolescència*

L'adolescència, a nivell neuronal almenys, es considera que continua fins els 25 anys aproximadament²⁸. Normalment durant aquest període de temps es sofreix tot un seguit de remodelacions neuronals, entre les que es troba el decreixement en el contingut de matèria grisa (zona rica en neurones i glia), amb canvis en la matriu i les connexions sinàptiques¹¹. Pel contrari durant aquest període, el que ocorre és que s'incrementa el volum i la integritat en la matèria blanca, on es sofreix un augment de la mielinització i s'augmenta la potència de la comunicació entre les diferents regions del cervell²⁹. Ara bé, també hi ha estudis que mostren que la comunicació entre regions s'incrementen a nivell local³⁰.

Durant aquest període és prou important el procés neurogènic, el qual permet la generació de noves neurones i contribueix a la plasticitat neuronal al llarg de la vida. En la neurogènesi a la regió hipocampal es generen noves cèl·lules granulars excitatòries a partir de cèl·lules precursoras radials de la glia (cèl·lules tipus I)³¹. Poc a poc van desenvolupant característiques i marcadors neuronals per les quals es van diferenciant en diferents fenotips (tipus IIa i IIb) fins arribar a l'estadi de neuroblast, durant el qual migra fins al lloc final. Una vegada en la capa corresponent començarà a desenvolupar-se com a neurona, primer immadura (tipus IV) i posteriorment madura (tipus V)^{31,32} (veure Figura 2). Això és visible en el fet de que en models de rata s'ha vist que durant l'adolescència en un marc de 24 hores, hi ha una generació de 17.000 noves cèl·lules en l'hipocamp, mentre que en adults aquesta taxa disminueix quasi en la meitat (9.000 noves cèl·lules)³³. Aquestes són incorporades en una capa de l'hipocamp anomenada gir dentat, la qual està principalment implicada en funcions cognitives³⁴. D'aquesta manera la neurogènesi hipocampal ha estat identificada com a predictor de la pèrdua cognitiva en models de rosegadors i una pèrdua d'aquesta pareix estar implicada en posteriors trastorns neuropsiquiàtrics en l'adultesa³⁵, com és el cas del desenvolupament d'una addicció³⁶ o de tendències ansioses i depressives¹¹.

El model de rata és un dels models més emprats a nivell preclínic. Això és degut a que els canvis neuronals que es duen a terme en humans durant l'adolescència també es donen en rates. Alguns exemples d'aquests canvis comuns són les alteracions que veim en el còrtex prefrontal i amb la taxa accelerada de creixement cel·lular (ja mostrada anteriorment, molt important pel present estudi com s'expondrà més endavant). Per altra part també és important per les similituds de comportament, degut a que els models rosegadors durant l'adolescència mostren alta despesa en interaccions socials, les quals guien els seus patrons alimenticis, sexuals, agressius i maternals en el futur individu adult. D'aquesta manera, es poden permetre fer estudis transversals amb animals d'experimentació, amb un pressupost acceptable i unes dades transposables als humans³⁷.

Per aquest estudi en particular, ens centrarem en la proliferació cel·lular en la capa granular de l'hipocamp denominada gir dentat, que és, tal i com s'ha mencionat amb anterioritat, una de les regions importants on té lloc la generació de noves neurones. Per seguir aquest procés s'empra el marcador endogen Ki-67, una proteïna nuclear que s'expressa en totes les fases del cicle cel·lular excepte en la fase de latència (G0), de manera que esdevé un marcador de proliferació en fases inicials³⁸ (veure Figura 2). Durant la mitosis aquesta proteïna es trasllada a la superfície cromosomal, permetent visualitzar les cèl·lules en divisió.

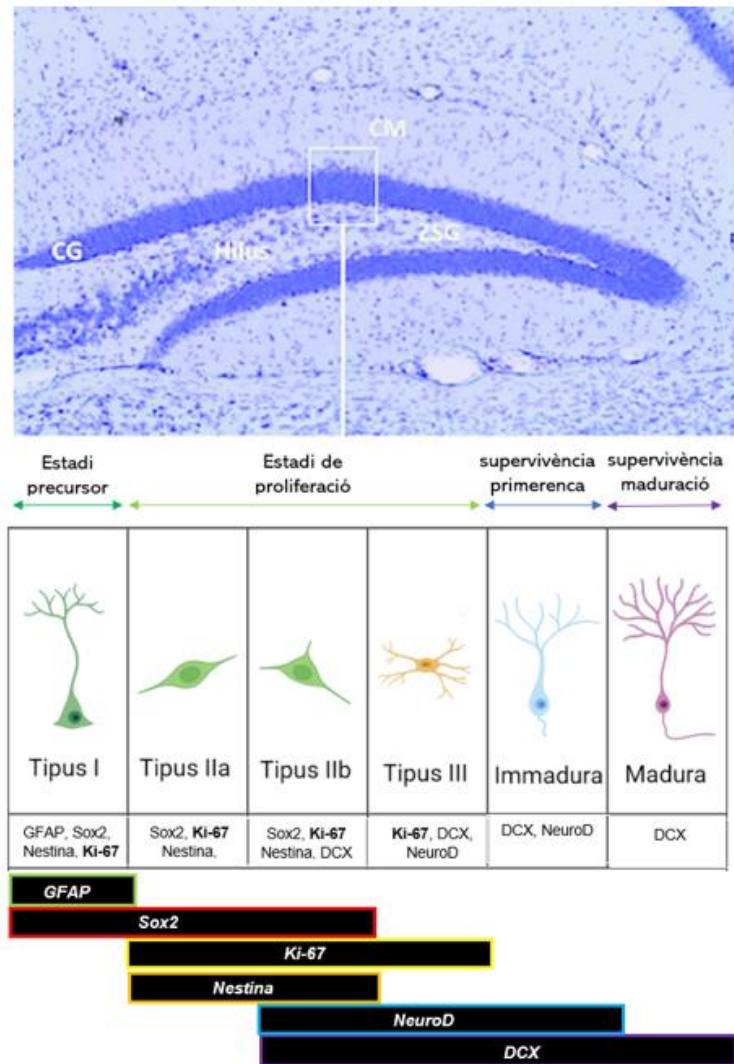


Figura 2: Representació de les fases de proliferació i maduració neuronal amb els marcadors endògens específics en cada cas, dins el gir dentat del hipocamp. El Ki-67 el trobem present en els estadis de tipus IIa, IIb i III. Imatge creada per Biorender^{32,56,57}.

1.3.2. Efectes de l'etanol en la neurogènesi hipocampal: edat i sexe

Totes les drogues d'abús, incloent l'etanol, indueixen alteracions en l'índex de neurogènesi hipocampal (veure revisions sobre el tema^{39,40}), ja sigui com a disminucions i/o increments en la regulació de les diferents fases d'estudi (p. ex., disminució post-administració aguda i/o increment durant les fases d'abstinència). Per altra banda, respecte a l'edat d'administració de l'etanol, durant l'adolescència s'han vist reduccions mantingudes en la neurogènesi hipocampal per l'exposició a etanol en relació a etapes adultes, degut a una major sensibilitat⁴¹.

Per una part, un dels motius de la disminució de la neurogènesi per la presa d'alcohol són els efectes del sistema immune i la producció d'espècies reactives d'oxigen en resposta l'etanol³⁶. L'acció d'aquests dona una resposta immune proinflamàtoria mitjançant l'activació dels

receptors TLR4, que porten l'alliberació de factors com el NFκB¹¹. Aquest promouen l'alliberació de citocines proinflamatòries i la disminució de les antiinflamatòries, sent els principals causants dels danys per intoxicació aguda²⁶.

Un altre dels factors més influents en la proliferació cel·lular en l'hipocamp durant la adolescència mediat per l'etanol és la baixada dels nivells de factor neurotròfic del cervell (BDNF)^{27,42}. Aquest té tot un seguit de funcions, entre les que podem destacar el control del desenvolupament neuronal, la modulació de les sinapsis en zones crítiques per la cognició i la memòria, i un efecte neuroprotector⁴². Pareix ser que disminucions temporals dels BDNF (causats, p. ex. en l'ús intermitent d'alcohol) porta a una disminució de la neurogènesi, a lo que si es suma l'efecte inflamatori (comentat anteriorment), se relaciona amb els déficits cognitius després de l'exposició a alcohol durant l'adolescència^{27,43}. Sent aquest factor un factor positiu pel creixement, baixos nivells d'aquest es relacionen amb observacions prèvies de que el volum i la neurogènesi hipocampal amb l'ús d'etanol durant l'adolescència es veu reduït⁴⁴.

Per tant, una disminució en els nivells de proliferació basal per l'exposició a alcohol es considera com un efecte neurotòxic. Malauradament, la gran majoria d'aquests estudis previs han estat realitzats principalment en models animals mascle, i per tant, hi ha una manca d'estudis en femelles, lo que fa una pobre translació dels resultats preclínics a la clínica. Entre els pocs estudis que un pot trobar a la literatura en referència al sexe, l'efecte de l'etanol sobre la neurogènesi ja s'ha vist que és diferent entre mascles i femelles, especialment pel fet de que, per una mateixa dosi, pot resultar més tòxic per les femelles. Per altra part, alguns estudis suggereixen diferències en el desenvolupament de matèria blanca en el cervell de manera dependent de sexe, tenint les al·lotes una decreixement augmentat del volum en el còrtex prefrontal⁴⁵.

Pareix ser que els mascles tenen una major neurogènesi i uns millors resultats cognitius que les femelles⁴⁶. Les diferències en la neurogènesi entre sexes pareix ser deguda a diferències en el contingut de receptors per hormones sexuals, com el receptors d'andrògens (AR) i el d'estrògens ((ER)-α,β)⁴⁷. S'aprecia un dimorfisme sexual en la densitat de receptors ER-β, tenint les femelles una major quantitat en relació als mascles⁴⁶. En aquests canvis pareixen influir també els cicles estrals⁴⁸. Les diferències poden estar relacionades amb la resposta per part de les neurones i la micròglia, la qual pareix ser diferent entre mascles i femelles²⁶. Aquestes pareixen respondre de manera diferent als factors estressants i donen un perfil diferenciat de inflamació i citocines⁴⁹.

Curiosament s'ha vist en estudis l'eficàcia de les hormones femenines pel seu paper neuroprotector, en especial la 17β-estradiol. El seu efecte pareix radicar en la regulació de la

via de les sirtuïnes (SIRT1), al inhibir l'acetilació de gens i permetent una disminució del estrès oxidatiu i la neurodegeneració²⁴.

Totes aquestes observacions pareixen mostrar mecanismes diferents entre mascles i femelles a una intoxicació etílica. Ara bé, la literatura amb estudis pre-clínic en ambdós sexes no està prou estesa, en part, degut a la dificultat de treballar amb els diferents cicles estrals. Per aquest mateix motiu, aquest estudi es basa en l'avaluació de les possibles diferències derivades del sexe del individu.

2. Objectius

L'objectiu general del present treball és estudiar els possibles canvis en la neurogènesi hipocampal induïts per l'administració aguda d'etanol en rates durant la adolescència primerenca, a més d'avaluar les possibles diferències que es poden donar entre mascles i femelles. Per aconseguir aquest objectiu, aquest treball es centra en el següents objectius específics:

Els objectius específics són:

1. La revisió de la literatura científica sobre els efectes neurotòxics de l'etanol en rates adolescents en funció del sexe.
2. L'aprenentatge de la metodologia necessària per avaluar marcadors de neurotoxicitat en l'hipocamp de rata (p.ex.: cèl·lules de nova proliferació, com un marcador de la primera fase de generació de noves neurones, per immunohistoquímica).
3. La quantificació dels resultats obtinguts.
4. La anàlisi estadística dels resultats obtinguts.
5. Preparació de la memòria i exposició oral del TFG.

3. Materials i mètodes

3.1. Animals d'experimentació

Per aquest estudi es van fer servir rates de la casta *Sprague-Dawley* (n=39) d'ambdós sexes (mascles, n=24; femelles, n=15) que acabaven d'entrar en la etapa d'adolescència primerenca (edat compresa entre els dies post-natals, PND, 28 i 42³⁷), i que tenien un pes mitjà d'entre 72-78 g els mascles i 61-64 g les femelles. Les rates varen ser criades a l'estabulari de la Universitat de les Illes Balears (UIB), i varen ser allotjades de 3 en 3 o de 4 en 4, en caixes estàndard amb material específic absorbent en base de fusta, amb aigua i pinso *ad libitum*. També es dugué a terme un control rigorós de les condicions ambientals: cicles de 12 hores de llum/foscor, temperatura: 22±1 °C i 70% d'humitat.

Tots els procediments es varen fer seguint les directrius ètiques del consell Europeu (*U.K Animals, Scientific Procedures, Act, 1986 and European Communities Council Directive 86/609/EEC*), i varen ésser aprovats per la comissió local de bioètica (*UIB-CAIB*). D'aquesta manera el nombre d'animals va ser el menor possible, però mantenint la representativitat de les mostres, i implicant el mínim dolor i patiment als animals.

3.2. Disseny experimental: tractament farmacològic, recollida de sang i de mostres cerebrals

Les rates es varen dividir en 2 grups experimentals per sexe: grup control (mascle, n=14; femella, n=11) i grup etanol (mascle, n=10; femella, n=4) (Figura 3). En un període de 24 h (PND 29 i PND 30), el grup control va rebre dues injeccions de solució salina (1 mg/Kg de 0,9% de NaCl), i el grup etanol les va rebre de 3 g/Kg d'etanol (d'una dilució d'etanol absolut al 40% en aigua). En ambdós casos les injeccions varen ser intraperitonealment a un volum de 3 mL/Kg (Figura 3).

PND	29	30	31
S	SALÍ	SALÍ	Cervells
E	ETANOL	ETANOL	
	SANG: 60 min post-injecció		SANG: 24h post-injecció

SALÍ 14 dies de 0,9% NaCl, i.p. 3 ml/kg
ETANOL: 3 g/kg (etanol absolut)

Figura 3: Disseny experimental. Administració de salí (0,9% NaCl, intraperitoneal 3 mL/Kg) i etanol (3 g/Kg intraperitoneal a partir d'una dilució al 40% d'etanol absolut) en els PND 29 i 30. Extracció de sang 60 min post-injecció a PND 29 i a PND 31 (24 h post-injecció). PND 31 sacrifici i extracció dels cervells.

Els PND 29 i 31 es varen procedir a recollir mostres de sang 60 min i 24 h post-tractament per mesurar els nivells d'etanol en plasma. El mateix PND 31 es va dur a terme el sacrifici dels animals i s'extragué el cervell per recollir les mostres cerebrals d'estudi. D'aquesta manera, es va obtenir el crani de l'animal per poder dur a terme l'extracció i dissecció del cervell. Per aquesta darrera passa es va preparar una caixa de goma-escuma plena de gel sec, dins de la qual es va col·locar un cilindre d'alumini que es mantenia a 4 °C i sobre el qual es dugué a terme el procés. Una vegada extret el cervell de dins la cavitat cranial la primera passa que es va fer va ser separar els dos hemisferis mitjançant un tall sagital. L'hemisferi esquerra va ser ràpidament submergit en una solució d'isopentà a baixes temperatures (-20 a -30 °C), i posteriorment emmagatzemat a -80 °C fins el moment del seu processament.

3.3. Quantificació dels nivells d'etanol en sang

Mitjançant un kit de quantificació d'etanol de la casa *EnzymChrom*TM es va analitzar la sang extreta el PND 29 i 31. Es basa en un mètode enzimàtic acoblat a una lectura colorimètrica d'un producte acolorit. En aquest cas, l'etanol és substrat de l'alcohol deshidrogenasa, que emprava com a cofactor el NAD⁺ i al reduir-se s'acobla al cromogen de formazan (MTT) i dona un producte acolorit. Aquest pot ser llegir a una longitud d'ona de 565 nm.

Per a dur-se a terme l'anàlisi es prepara una corba patró (per duplicat) a partir d'un estàndard d'etanol al 1%. Posteriorment, en una placa de 96 pouets, es pipetejà un volum de 10 µL del patró, i 10 µL de mostra (dilució ½ i sense diluir). Un cop això s'afegí un volum de 90 µL de *Working Reagent*, un reactiu que conté el buffer amb les condicions necessàries per la reacció, els enzims, l'NAD⁺ que funciona com a cofactor i el MTT. S'agità i deixà incubant 30 minuts a temperatura ambient, i posteriorment s'aturà la reacció amb 100 µL de solució d'STOP. Finalment es llegí la densitat òptica a 565nm.

A partir de la corba patró i dels valors obtinguts, es pogué calcular la concentració d'etanol a partir de la següent fórmula:

$$[Etanol] = \frac{OD_{mostra} - OD_{blanc}}{pendent\ de\ la\ recta} \times FD (\%)$$

Tenint en compta la conversió de que un 1% d'etanol és equivalent a 785 mg/dL, aconseguim les concentracions d'etanol en sang.

3.4. Obtenció dels talls histològics de la regió hipocampal

Per obtenir talls histològics de la regió hipocampal es va emprar el mig hemisferi esquerre congelat prèviament. Mitjançant la utilització d'un criòstat es varen recollir talls histològics de 30 µm de gruix al llarg de l'estructura de l'hipocamp (des del Bregma -1,72 mm fins al -6,8 mm aproximadament), assegurant-nos així de tenir representació de tot l'hipocamp (estructura d'interès a on mesurarem el nivell de neurogènesi). Aquests talls es van anar col·locant sobre portaobjectes, que posteriorment eren un altra vegada emmagatzemats a -80 °C fins el moment de l'anàlisi de marcadors de proliferació cel·lular (en aquest cas el Ki-67) mitjançant tècniques de immunohistoquímica.

La manera en la que es col·loquen els talls sobre els portaobjectes ha de ser prou específica per a la posterior anàlisi. Els portaobjectes s'enumeraren en sèries (1, 2 i 3) i subsèries (A, B, C, D, E, F, G, H). La recollida es comença quan s'aprecia el tancament del 3r ventricle (just abans de que comenci la regió hipocampal), i a partir d'aquest moment es recullen els talls. El primer tall (que anomenarem 1), s'adherí al cantó dret inferior del portaobjectes A1, el segon tall en el cantó inferior de la B1, i així progressivament fins al portaobjectes H1 (veure figura 4, s'inclou una representació fins a la secció D1 que continuaria igual fins a la H1). Un cop això, el 9è tall es recollí en el cantó dret superior de la A1, i es seguí l'ordre esmentat, col·locant-se els talls de manera que "zig-zaguejen" (aquest és el mètode estandaritzat per recollir tota la regió hipocampal) fins a incloure 8 talls per a cada portaobjectes. Un cop s'omplí el darrer buit de la H1, es passà a la sèrie 2 i es seguí el mateix procediment. Al final s'hauran obtingut uns 96 talls representatius (Figura 4).

Rat ID#	57	41	25	9	+
A1	49	33	17	1	+
Rat ID#	58	42	26	10	+
B1	50	34	18	2	+
Rat ID#	59	43	27	11	+
C1	51	35	19	3	+
Rat ID#	60	44	28	12	+
D1	52	36	20	4	+
Rat ID#	121	105	89	73	+
A2	113	97	81	65	+
Rat ID#	185	169	153	137	+
A3	177	161	145	129	+

Figura 4: Mostra representativa de la manera en la que es varen recollir les seccions cerebrals en els portaobjectes. Cada número representa el tall específic que es va efectuar ordinalment.

3.5. Immunohistoquímica

Com ja s'ha introduït anteriorment, en aquest treball s'estudia l'efecte de l'administració aguda intraperitoneal d'etanol (3 g/Kg) sobre l'índex de proliferació de noves cèl·lules en la regió hipocampal, concretament al gir dentat (DG, "*dentate gyrus*") de rata. S'emprà el marcador endogen Ki-67⁵⁰, que marca selectivament les cèl·lules que es troben en proliferació cel·lular. Seguint el protocol estandarditzat⁵¹, s'agafaren els portaobjectes que contenien la subsèrie A (A1, A2 i A3) i que inclouen 1 de cada 8 seccions de tot l'hipocamp de la regió anterior, mitja i posterior respectivament, amb els corresponents talls histològics (30 µm). Aquests es varen fixar en paraformaldehid 4% durant 1 hora, seguidament d'un rentat amb PBS de 5 minuts i la posterior exposició a l'antigen mitjançant una incubació de 1 hora a 90 °C en el bany termostatitzat (citrat sòdic 10%, pH 6,0). Després del temperament i una rentada ràpida amb PBS, es va dur a terme la inhibició de les peroxidases endògenes amb una incubació de 30 minuts amb H₂O₂ al 0,3% (60 mL d'una solució al 3% + 540 mL PBS). Una vegada efectuats una sèrie de rentats amb PBS, es va dur a terme al segellat dels límits dels portaobjectes amb un retolador apolar (*PAP pen*) per evitar que es perdés líquid durant les passes posteriors. A continuació, s'incubaren durant 1 hora amb 350 µL de BSA amb 2% de sèrum de xot a cada portaobjectes, de manera que es van bloquejar les possibles unions inespecífiques. Seguidament, es descarta el diluent i s'incuba amb l'anticòs policlonal per el Ki-67 durant tota la nit i en agitació (diluint 1:20.000 d'una dilució al 1/100). Entrant el segon dia, es descartà l'anticòs pel Ki-67, es rentà amb PBS i s'incubà durant 1 hora en cambres d'hibridació amb un anticòs secundari de conill (1:1000). S'administrà posteriorment 350 µL del vector del complex avidina/biotina (1h d'incubació), que serà mitjançant el qual es detectarà la unió específica, en addició al mix del cromogen 3,3'-diaminobencidina (DAB: 720 mg DAB + 3mL H₂O₂ 3% en 600 mL d'acetat de sodi), que s'afegí posteriorment durant 6 min. En aquest cas el DAB és important perquè en presència de la peroxidasa, causa un precipitat marró insoluble en alcohol que serà detectat baix el microscopi. Finalment, es varen tenyir amb violat de cresil les mostres (tinció dels nuclis), i es varen deshidratar mitjançant una bateria d'alcohols de concentracions creixents, amb una passa final per xilè. La darrera passa va ser l'aplicació del cobreobjectes amb una gota d'adhesiu sobre el portaobjectes.

3.6. Comptatge de les cèl·lules Ki-67⁺

Un cop finalitzada la passa de la immunohistoquímica es passà al recompte de cèl·lules positives pel marcador Ki-67. Per a fer-ho es van codificar les mostres de manera aleatòria, de manera que, al tenir el propi comptatge un cert caràcter subjectiu, el tècnic no es veiés influenciat a l'hora del comptatge. Una vegada això, mitjançant un microscopi òptic *Leica DMR*, es comptaren específicament les cèl·lules positives (presència de precipitat marró) que trobàvem en el DG. Per fer el comptatge es mirà cada portaobjectes de manera individual, començant pels A1 i arribant fins als A3, i seguint el mateix ordre de “zig-zag” que es seguí a l'hora de recollir les mostres (Figura 5).

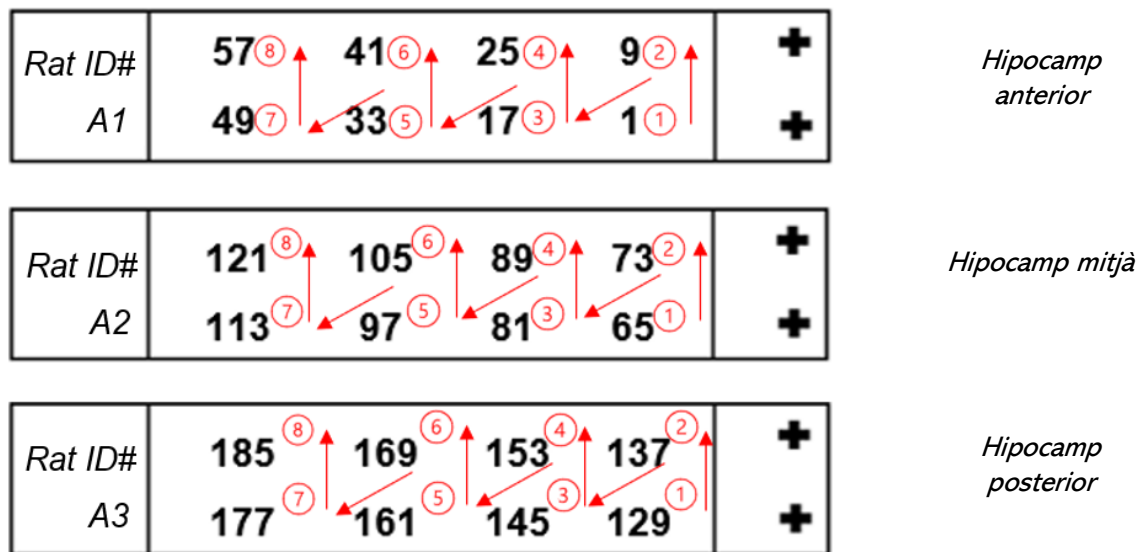


Figura 5: Ordre seguit pel comptatge de cèl·lules. Es mirà exclusivament la subsèrie A, que representa 1 de cada 8 seccions de tot l'hipocamp (part anterior, mitja i posterior) i es seguí el mateix ordre emprat per la recollida de seccions histològiques.

3.7. Anàlisi de dades

Les dades es varen processar i representar mitjançant el programa *GraphPad Prism*, versió 8.

La concentració d'etanol en plasma es representa en mg/dL per a cada sexe i en funció del grup control respectiu. L'anàlisi estadístic es va fer mitjançant un ANOVA de dues vies (variables independents: sexe i temps d'anàlisi) seguit del test de comparacions múltiples de *Sidak*.

Per l'anàlisi de dades de la proliferació cel·lular, a partir del comptatge s'aconseguí la suma total de cèl·lules positives per cada individu (A1+A2+A3). Ara bé, aquest nombre obtingut es va multiplicar pel factor de mostreig (x8), degut a que, per cada animal, es quantificà 1 de cada 8 seccions recollides. El comptatge fou efectuat per dos investigadors independents (un

d'ells l'alumne d'aquest treball) i els resultats que s'exposaran es basaran en les mitjanes d'aquestes. Una vegada això es representen les dades com la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM), i només es considera que existeixen canvis significatius per aquelles probabilitats amb un p -valor $\leq 0,05$. Per fer-ho es va fer un ANOVA de dues vies (variables independents: tractament i sexe).

4. Resultats

4.1. Diferències farmacocinètiques de l'etanol entre sexes

Es va dur a terme la quantificació de la concentració d'etanol en sang (en mg/dL) als 60 minuts de la primera injecció i a les 24 h de la segona. Com veiem en la Figura 6, l'ANOVA de dues vies, no va trobar diferències significatives entre sexes ($F_{1,12}=0,37$, $p=0,550$), però sí un efecte significatiu de temps ($F_{1,12}=23,28$, $p=0,0004$). Els nivells d'etanol en plasma, tant per rates mascles com per femelles, es varen comparar amb els grups controls respectius (la gràfica que es mostra inclou els valors calculats respecte al grup control). Com era d'esperar, l'etanol en plasma estava incrementat 60 minuts post-tractament (mascles: $t=5,50$, $df=21$, $***p<0,0001$; femelles: $t=3,77$, $df=13$, $**p=0,0024$; Figura 6). Aquests increments varen disminuir 24 h post-tractament (mascles: $t=3,48$, $df=21$, $**p=0,0023$; femelles: $t=0,63$, $df=13$, $p=0,539$, n.s.), però encara eren estadísticament significatius a les rates mascle (Figura 6).

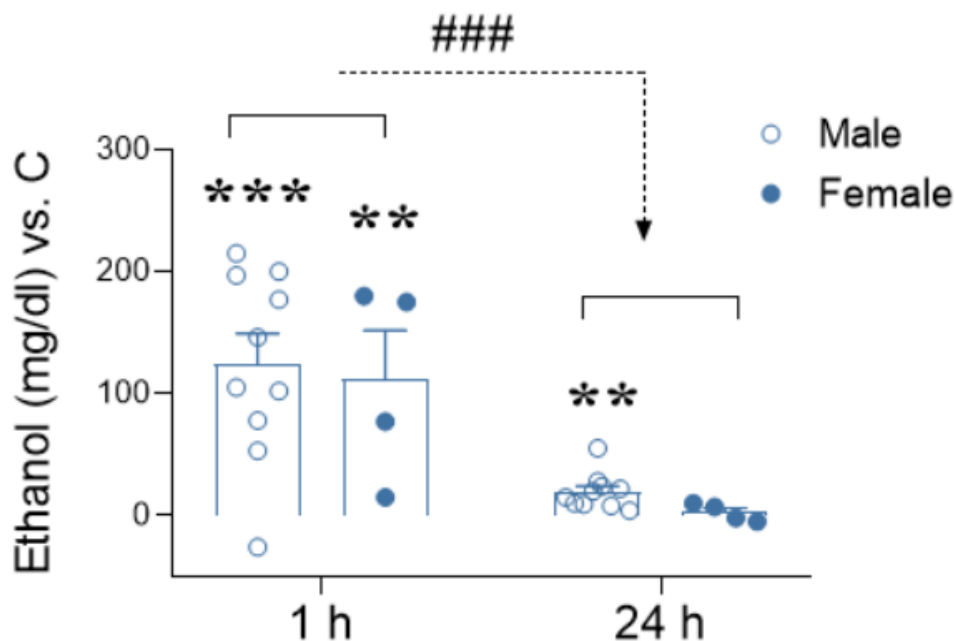


Figura 6: Progressió dels nivells d'etanol (mg/dL) en plasma sanguini als 60 min i 24 h post-injecció. Valors extrets a partir de la normalització en base als valors basals dels individus control.

4.2. Regulació de la primera etapa de la neurogènesi hipocampal en base a l'administració aguda d'etanol en rates mascles i femelles adolescents

A partir dels resultats obtinguts, mitjançant el comptatge cel·lular, es van estudiar els efectes en la proliferació cel·lular en el gir dentat de l'hipocamp després de la administració aguda de 3 g/Kg d'etanol (2 dosis en un període de 24 h). A més es dugué la comparativa també entre mascles i femelles, i se prengueren com a referència grups de rates mascles i femelles amb administració de solució salina. L'ANOVA de dues vies mostra que no hi ha diferències causades pel tractament ($F_{1,30}=0,69$, $p=0,688$), ni pel sexe ($F_{1,30}=0,15$, $p=0,704$), ni una interacció significativa tractament x sexe ($F_{1,30}=0,09$, $p=0,770$; Figura 7). És a dir, tant mascles com femelles no mostren diferències en l'índex de proliferació de noves cèl·lules a l'hipocamp després de l'administració aguda d'etanol. A més, no s'observen diferències entre sexes, ni quan se'ls aplica el tractament, ni en el cas de les situacions control.

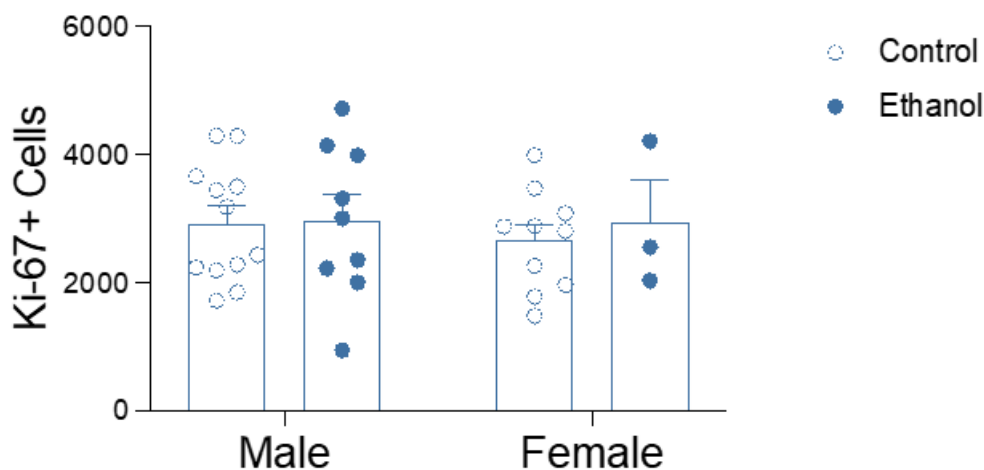
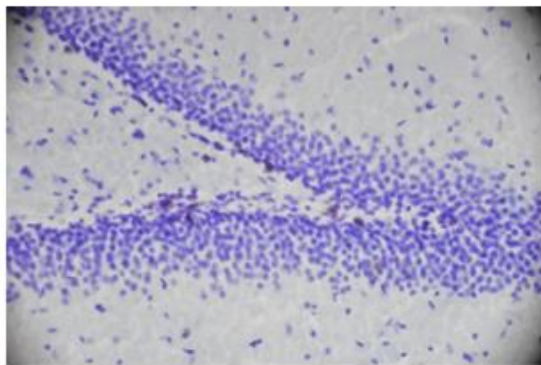
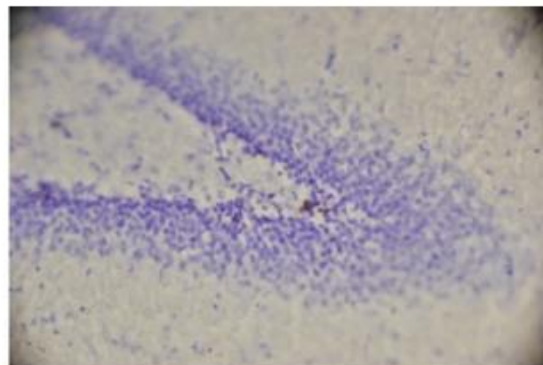


Figura 7: Resultats obtinguts després del comptatge per les cèl·lules Ki-67(+) (mitjana del comptatge de dos investigadors). Eix y: número de cèl·lules positives pel marcador de proliferació Ki-67. Eix x: sexe (mascle i femella). Dins cada sexe s'especifica en blau els valors individuals de cada animal tractat amb etanol (cercles blaus) i aquells tractats amb salí al 0,9% (cercles blancs).

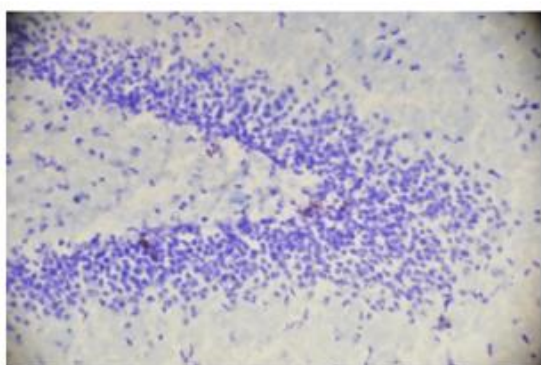
Aquests resultats queden també reflectits en les imatges representatives del gir dentat (en el hipocamp) que s'han pres de cada grup experimental (Figura 8).



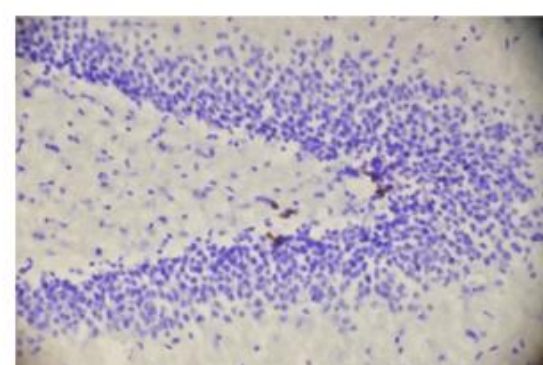
Masclle control



Femella control



Masclle etanol



Femella etanol

Figura 8: Imatges representatives del marcatge per Ki-67 dels diferents grups experimentals. Cèl·lules positives marcades en marró dins de la capa granular del gir dentat (marcat en lila). Imatges obtingudes amb un microscopi òptic Leica DMR amb un augment de 40x.

Com s'ha comentat, el resultat del comptatge procedeix de la mitjana aritmètica de la quantificació de dos investigadors. Per comprovar que ambdós comptatges tinguessin validesa es va calcular un coeficient de correlacions i un gràfic de dispersions (veure Figura 9).

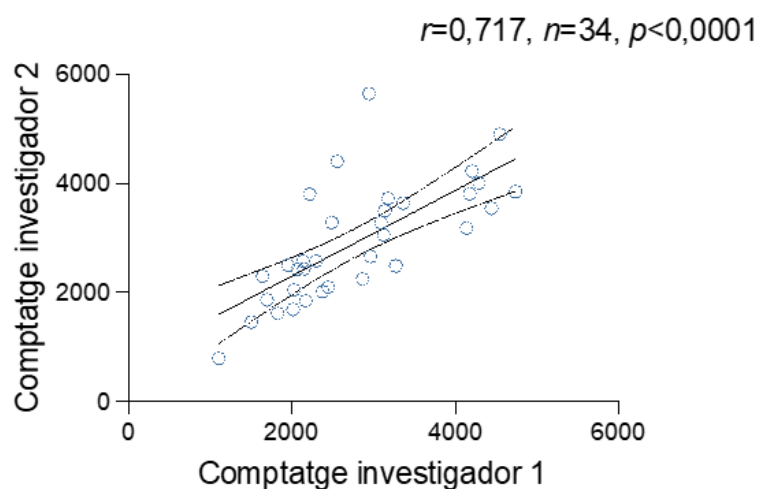


Figura 9: Gràfic de dispersió dels dos comptatges i coeficient de correlació entre elles.

El factor de correlació és positiu i proper a 1, per lo que es veu que entre els dos comptatges hi ha bona correlació, i per ende, validesa en la metodologia emprada per part de l'estudiant d'aquest treball (investigador 2; Figura 9).

5. Discussió

La hipòtesi principal d'aquest treball era que l'administració aguda d'etanol durant una etapa primerenca de l'adolescència induiria neurotoxicitat mesurada com a una inhibició de la proliferació cel·lular (primera fase de la neurogènesi), i que aquesta neurotoxicitat alhora seria diferent en funció del sexe del animal. Els resultats principals demostren, per contra, que aquest paradigma d'administració d'etanol no és suficient per induir canvis en la proliferació cel·lular hipocampal, ni en rates mascles ni femelles. Aquests resultats han estat validats per dos investigadors independents. A més, els nivells d'etanol en plasma demostren que el tractament farmacològic va ser realitzat correctament.

Aquests resultats són discordants amb altres estudis efectuats sobre la inhibició de la neurogènesi hipocampal per acció del etanol. Podem destacar per exemple el de Morris i col·laboradors (2018), en el qual varen veure un descens del 28 al 33% en la proliferació cel·lular en el gir dentat⁵². Ara bé en aquest estudi radiquen certes diferències amb el nostre, partint del punt de que la seva dosi va ser administrada durant 4 dies i amb una dosi superior d'etanol (5 g/Kg de pes). A més el seu estudi emprà únicament mascles i en una etapa adolescent més avançada (PND 35, corresponent a l'adolescència mitjana). Aquestes diferències podrien explicar la discordança entre els nostres resultats. Especialment atribuïm el factor temps i dosis, degut a que el procés de neurogènesi és un procés complex que implica factors de transcripció i adaptacions cel·lulars que possiblement no es dugueren a terme en el poc temps que el vam efectuar. A més hem de tenir en compte que l'adolescència és un període d'alta plasticitat, i en un període tan precoç com és l'adolescència primerenca, la disminució de la proliferació pogué quedar emmascarada³³.

Revisant la bibliografia podem observar que els resultats realment són discordants amb la majoria de treballs efectuats^{43,44,52}, però hem de tenir en compte que el model emprat és prou específic i es veuen diferències grans entre els seguits per dits estudis i el nostre. El nostre en particular se caracteritza per haver fet mesures res més entrar en l'etapa adolescent, ja que es volia veure com afectava iniciar el consum de manera primerenca. Avaluar aquesta etapa en comparació amb altres de més tardanes, podria implicar que encara no hagin començat a experimentar els canvis neurològics que es donen típicament en aquesta edat. Això implicaria que al estar més properes a etapes infantils que no d'etapes adultes els canvis que se podrien atribuir al sexe encara no són latents, per lo que això justificaria el no haver trobat diferències ni entre sexes ni entre tractaments. A més a més, hem de tenir en compte que els efectes neurotòxics derivats de l'etanol estan també relacionats íntimament amb la capacitat metabolitzant del fetge, ja que si aquest és capaç d'eliminar major quantitat, menor quedarà lliure pel cervell. Ara bé relacionat amb la edat s'ha vist que a nivell hepàtic i

d'antioxidants tenen una major activitat en edats més infantils⁵³. La metabolització de l'etanol es dona al fetge mitjançant l'alcohol deshidrogenasa i el sistema microsomal, els quals empren cofactors per a dur a terme la oxidoreducció dels compostos, i per això la importància addicional dels sistemes antioxidants. Aquesta defensa disminuiria també l'estrès oxidatiu i tindria efecte neuroprotector sobre l'hipocamp. Això podria implicar que en etapes tan primerenques tinguin una protecció afegida cap aquestes en dosi agudes de dita concentració. Dit fet seria contrastable amb el fet de que sí s'aprecien canvis en etapes adolescents posteriors, com és el cas exposat de Morris i col·laboradors (2018) i que en el nostre estudi les dades es mantinguin, encara que els estudis no són directament comparables degut a la durada i dosi administrades, i per tant s'haurien de fer més estudis per entendre les possibles diferències entre sexes induïdes per l'administració d'etanol.

Tot i el gran impacte que té l'alcohol sobre el cos humà, les majors conseqüències que s'ha vist que tenia l'etanol sobre el cervell tenen la seva expressió durant la edat adulta^{22,54}. Aquí veuríem un especial interès degut a tot el seguit de dèficits cognitius causats posteriorment en l'individu adult, i el fet de que causa un fenotip adolescent conservat²². Les conductes adolescents es fan latents amb un augment de les conductes de risc, amb un estat proansios i respostes emocionals exacerbades³⁷. A més el desenvolupament de tolerància, afegits a dites conductes donarà peu a desenvolupar addiccions a altres drogues d'abús¹⁵.

Llavors, com hem comentat, l'adolescència és una època de continua remodelació de les capes i no són tan fàcilment detectables aquests canvis a etapes tan primerenques d'aquesta, sinó que es fan més presents cap a l'adolescència mitjana-tardana i l'edat adulta. Ara bé, després de totes les conductes exposades queda baix estudi l'efecte de dosi agudes sobre aquesta proliferació cel·lular. Per això es creu que és d'especial interès fer més estudis d'aquest patró degut a la seva prevalença en la població jove, com ja s'ha vist¹ i resulta una època crítica pel desenvolupament neuronal del individu¹¹.

Pel que fa a les concentracions d'etanol en sang, amb els resultats mostrats es varen poder avaluar les diferències de metabolització en aquests punts de temps, a més de veure la progressió de la seva eliminació i poder establir una taxa de velocitat de metabolització entre els diferents sexes. Podem veure el fet de que no existeixen diferències significatives en la concentració d'etanol en sang entre sexes. Els resultats al cap de 1 h ens indicaria una capacitat absorbiva similar entre sexes. Ara bé a les 24 h, al fer comparacions amb el grup control respectiu, veiem que mentre que a les femelles ja quasi no els hi resta etanol en sang, als mascles encara els queda una petita quantitat. Això concordaria amb els resultats de Eaton i col·laboració (2022), en que varen trobar que les femelles tenen una major capacitat per metabolitzar l'etanol en altres espècies, al tenir aquestes un 30% més de alcohol deshidrogenasa en el estómac en comparació als mascles⁵⁵. Aquestes diferències entre sexes

també es donen en rates com demostren el estudis de Quintanilla i col·laboradors (2007)³, tot i que aquests es dugueren a terme en etapes adultes.

6. Conclusions

En base a les dades obtingudes i de la revisió de literatura científica consultada, es poden establir les següents conclusions.

1. No s'observen diferències significatives en l'índex de proliferació cel·lular en la regió hipocampal pel marcador Ki-67, ni degut al tractament (administració aguda d'etanol), ni degut al sexe.
2. Les drogues d'abús com l'alcohol són capaces d'afectar a les regions hipocampals de l'individu en etapes posteriors, causant dèficits cognitius i alteracions neurològiques.
3. Dosis agudes d'etanol poden afectar a canvis neurofisiològics, especialment en etapes tan sensibles com l'adolescència i tenir repercussions en les conductes de l'individu, com la propensió a la drogaddicció.

En posteriors estudis s'analitzarà també la mort cel·lular per veure els possibles efectes neuroinflamatoris del tractament en aquestes dosi i espai de temps.

7. Agraïments

Aquest estudi va ser elaborat al Laboratori de Neurofarmacologia de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Els estudis han estat finançats pel Projecte d'Investigació de la Delegació del Govern per al Pla Nacional sobre Drogues (2020/001) titulat "Consecuencias conductuales y neuroquímica del consumo combinado de alcohol y cocaína en la adolescència en rates macho y hembra: tratamiento farmacológico" i liderat per la Dra. M. Julia García Fuster, tutora d'aquest treball.

També, personalment agrair als integrants del grup d'investigació de Neurofarmacologia, començant per la Dra. M. Julia García Fuster per la gran confiança depositada en jo. Per suposat també a Carles Colom, Dr. Cristian Bis, Sandra Ledesma, Dra. Elena Hernández, Dr. Fernando Yáñez, Dra. Celia Garau i Jordi Jornet per la seva inestimable ajuda i per tot el que m'han ensenyat. Moltes gràcies.

8. Bibliografía

1. Español de las Drogas las Adicciones Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, O. Monografía. Alcohol 2021: Consumo y consecuencias.
2. Pace, A. *et al.* Pancreas and liver injury are associated in individuals with increased alcohol consumption. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**, 1241–1246 (2009).
3. Quintanilla, M. E., Tampier, L., Sapag, A., Gerdtzen, Z. & Israel, Y. Sex differences, alcohol dehydrogenase, acetaldehyde burst, and aversion to ethanol in the rat: a systems perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, (2007).
4. Kumar, S. *et al.* The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology* *2009* **205:4** **205**, 529–564 (2009).
5. Martín Bustos, M. Núcleo accumbens y el sistema motivacional a cargo del apego. *Revista chilena de neuro-psiquiatría* **46**, 207–215 (2008).
6. Artola, A. & Singer, W. Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature* **330**, 649–652 (1987).
7. King, A. C., de Wit, H., McNamara, P. J. & Cao, D. Rewarding, Stimulant, and Sedative Alcohol Responses and Relationship to Future Binge Drinking. *Archives of General Psychiatry* **68**, 389–399 (2011).
8. Insel, T. R. Rethinking schizophrenia. *Nature* *2010* **468:7321** **468**, 187–193 (2010).
9. Centanni, S. W., Burnett, E. J., Trantham-Davidson, H. & Chandler, L. J. Loss of δ -GABAA receptor-mediated tonic currents in the adult prelimbic cortex following adolescent alcohol exposure. *Addiction biology* **22**, 616 (2017).
10. Simon, N. W. & Moghaddam, B. Neural processing of reward in adolescent rodents. *Developmental Cognitive Neuroscience* **11**, 145–154 (2015).
11. Spear, L. P. Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* **19**, 197–214 (2018).
12. White, A. M. & Swartzwelder, H. S. Age-related effects of alcohol on memory and memory-related brain function in adolescents and adults. *Recent Dev Alcohol* **17**, 161–176 (2005).
13. Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S. & Hussein, D. E. E. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* **19**, (2021).
14. Dichter, G. S., Damiano, C. A. & Allen, J. A. Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: Animal models and clinical findings. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* **4**, 1–43 (2012).
15. Luo, A. H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R. A., Lupica, C. R. & Aston-Jones, G. Linking context with reward: A functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* (1979) **333**, 353–357 (2011).
16. Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. & Guerri, C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* **183**, 4733–4744 (2009).

17. Davidow, J. Y., Foerde, K., Galván, A. & Shohamy, D. An Upside to Reward Sensitivity: The Hippocampus Supports Enhanced Reinforcement Learning in Adolescence. *Neuron* **92**, 93–99 (2016).
18. Davachi, L. Item, context and relational episodic encoding in humans. *Current Opinion in Neurobiology* **16**, 693–700 (2006).
19. Palombo, D. J., Hayes, S. M., Reid, A. G. & Verfaellie, M. Hippocampal contributions to value-based learning: Converging evidence from fMRI and amnesia. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* **19**, 523–536 (2019).
20. Lees, B., Meredith, L. R., Kirkland, A. E., Bryant, B. E. & Squeglia, L. M. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. *Pharmacol Biochem Behav* **192**, (2020).
21. Salling, M. C. *et al.* Alcohol Consumption during Adolescence in a Mouse Model of Binge Drinking Alters the Intrinsic Excitability and Function of the Prefrontal Cortex through a Reduction in the Hyperpolarization-Activated Cation Current. *Journal of Neuroscience* **38**, 6207–6222 (2018).
22. Fleming, R. L., Acheson, S. K., Moore, S. D., Wilson, W. A. & Swartzwelder, H. S. In the Rat, Chronic Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Alters the Ethanol Sensitivity of Tonic Inhibition in Adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **36**, 279–285 (2012).
23. Miller, V. M. *et al.* Sex effects of interleukin-6 deficiency on neuroinflammation in aged C57Bl/6 mice. *Brain Res* **1318**, 11–22 (2010).
24. Khan, M., Shah, S. A. & Kim, M. O. 17 β -Estradiol via SIRT1/Acetyl-p53/NF- κ B Signaling Pathway Rescued Postnatal Rat Brain Against Acute Ethanol Intoxication. *Mol Neurobiol* **55**, 3067–3078 (2018).
25. Brann, D. W., Dhandapani, K., Wakade, C., Mahesh, V. B. & Khan, M. M. Neurotrophic and Neuroprotective Actions of Estrogen: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Steroids* **72**, 381 (2007).
26. Barney, T. M. *et al.* Circulating corticosterone levels mediate the relationship between acute ethanol intoxication and markers of NF- κ B activation in male rats. *Neuropharmacology* **210**, (2022).
27. Seemiller, L. R. & Gould, T. J. The effects of adolescent alcohol exposure on learning and related neurobiology in humans and rodents. *Neurobiol Learn Mem* **172**, (2020).
28. Gogtay, N. *et al.* Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8174–8179 (2004).
29. Lebel, C. & Beaulieu, C. Longitudinal development of human brain wiring continues from childhood into adulthood. *Journal of Neuroscience* **31**, 10937–10947 (2011).
30. Luna, B., Marek, S., Larsen, B., Tervo-Clemmens, B. & Chahal, R. An integrative model of the maturation of cognitive control. *Annu Rev Neurosci* **38**, 151–170 (2015).
31. Kempermann, G., Song, H. & Gage, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, (2015).
32. Mandyam, C. D. & Koob, G. F. The addicted brain craves new neurons: putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci* **35**, 250–260 (2012).

33. Cameron, H. A. & McKay, R. D. G. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology* **435**, 406–417 (2001).
34. Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. & Shors, T. J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* **2**, 260–265 (1999).
35. Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K. M. & Ming, G. L. Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **8**, (2016).
36. Canales, J. J. Adult neurogenesis and the memories of drug addiction. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* **257**, 261–270 (2007).
37. Spear, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 417–463 (2000).
38. Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. & Wojtowicz, J. M. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* **115**, 97–105 (2002).
39. Avchalumov, Y. & Mandyam, C. D. Plasticity in the Hippocampus, Neurogenesis and Drugs of Abuse. *Brain Sci* **11**, (2021).
40. Mandyam, C. D. & Koob, G. F. The Addicted Brain Craves New Neurons: Putative Role for Adult-Born Progenitors in Promoting Recovery. *Trends in Neurosciences* **35**, 250 (2012).
41. Liu, W. & Crews, F. T. Persistent decreases in adult subventricular and hippocampal neurogenesis following adolescent intermittent ethanol exposure. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **11**, 151 (2017).
42. Kowiański, P. *et al.* BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* **38**, 579 (2018).
43. Fernandez, G. M., Lew, B. J., Vedder, L. C. & Savage, L. M. Chronic intermittent ethanol exposure leads to alterations in brain-derived neurotrophic factor within the frontal cortex and impaired behavioral flexibility in both adolescent and adult rats. *Neuroscience* **348**, 324–334 (2017).
44. Nagel, B. J., Schweinsburg, A. D., Phan, V. & Tapert, S. F. Reduced hippocampal volume among adolescents with alcohol use disorders without psychiatric comorbidity. *Psychiatry Research: Neuroimaging* **139**, 181–190 (2005).
45. Nagel, B. J. *et al.* Age-related changes in prefrontal white matter volume across adolescence. *NeuroReport* **17**, 1427–1431 (2006).
46. Yagi, S. & Galea, L. A. M. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **44**, 200 (2019).
47. Yagi, S. & Galea, L. A. M. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **44**, 200 (2019).
48. Mitterling, K. L. *et al.* Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterone receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* **518**, 2729 (2010).
49. Mangold, C. A. *et al.* Sexually divergent induction of microglial-associated neuroinflammation with hippocampal aging. *Journal of Neuroinflammation* **14**, (2017).

50. The Ki-67 protein: From the known and the unknown - Scholzen - 2000 - Journal of Cellular Physiology - Wiley Online Library. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3%3C311::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-9](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3%3C311::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-9).
51. García-Fuster, M. J., Perez, J. A., Clinton, S. M., Watson, S. J. & Akil, H. Impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis in an animal model of differential propensity to drug abuse. *European Journal of Neuroscience* **31**, 79–89 (2010).
52. Morris, S. A., Eaves, D. W., Smith, A. R. & Nixon, K. Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus* **20**, 596 (2010).
53. Miyagi, S. J., Brown, I. W., Chock, J. M. L. & Collier, A. C. Developmental changes in hepatic antioxidant capacity are age- and sex-dependent. *J Pharmacol Sci* **111**, 440 (2009).
54. Spear, L. P. Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: Studies using rodent models. *Neurosci Biobehav Rev* **70**, 228 (2016).
55. Eaton, S. E., Jagielo-Miller, J. E., Prendergast, M. A. & Akins, C. K. Sex differences in alcohol dehydrogenase levels (ADH) and blood ethanol concentration (BEC) in Japanese quail. *Poultry Science* **101**, 101790 (2022).
56. (PDF) Los fármacos antidepresivos como reguladores de la neurogénesis hipocámpica de roedores y humanos adultos. https://www.researchgate.net/publication/262763819_Los_farmacos_antidepresivos_como_reguladores_de_la_neurogenesis_hipocampica_de_roedores_y_humanos_adultos.
57. von Bohlen Und Halbach, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* **345**, 1–19 (2011).