

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Prevención del déficit de memoria inducido por la exposición  
intensiva a etanol en ratón mediante el compuesto  
neuroprotector 3,3'-diindolilmetano**

**Prevention of the memory deficits induced by intensive  
ethanol exposure in mice by the neuroprotective compound  
3,3'-diindolylmethane**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Nuria Morales Puerto**

**Directores**

**M<sup>a</sup> Esther O'Shea Gaya**  
**M<sup>a</sup> Dolores Gutiérrez López**  
**Rebeca Vidal Casado**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Prevención del déficit de memoria inducido por la  
exposición intensiva a etanol en ratón mediante el  
compuesto neuroprotector 3,3'-diindolilmetano**

Prevention of the memory deficits induced by intensive ethanol exposure  
in mice by the neuroprotective compound 3,3'-diindolylmethane

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Nuria Morales Puerto**

DIRECTORAS

M<sup>a</sup> Esther O'Shea Gaya  
M<sup>a</sup> Dolores Gutiérrez López  
Rebeca Vidal Casado





# ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>9</b>
<b>Introducción</b>	<b>15</b>
<b>Bloque I - Etanol</b>	<b>15</b>
<b>1. El alcohol como droga de abuso</b>	<b>15</b>
1.1. DATOS Y TENDENCIAS ACTUALES SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL	15
1.2. IMPACTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE LA SALUD	17
1.3. PATRONES DE CONSUMO DE ALCOHOL	18
1.3.1. Datos estadísticos sobre el consumo tipo <i>binge drinking</i>	19
<b>2. Etanol</b>	<b>21</b>
2.1. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y METABOLISMO DEL ETANOL	21
2.2. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE EL ORGANISMO	23
2.2.1. Efectos sistémicos	23
2.2.2. Efectos en el sistema nervioso central	24
2.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DAÑO CEREBRAL DEL ETANOL	25
2.3.1. Inhibición de receptores ionotrópicos glutamatérgicos	26
2.3.2. Alteración de la plasticidad sináptica	26
2.3.3. Remodelación de la matriz extracelular	27
2.3.4. Inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial	28
<b>Bloque II - Memoria</b>	<b>31</b>
<b>1. La función cognitiva de memoria</b>	<b>31</b>
1.1. LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO	32
<b>2. El hipocampo</b>	<b>33</b>
2.1. NEUROANATOMÍA HIPOCAMPAL	33
2.2. RELACIÓN FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO CON LA MEMORIA	35
2.3. EL HIPOCAMPO Y LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO	37
2.4. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL	37
<b>3. Neuroplasticidad: mecanismo de aprendizaje y memoria</b>	<b>38</b>
3.1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	39
3.1.1. Receptores ionotrópicos de glutamato: NMDA y AMPA	40
3.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato: mGluR2	46
3.1.3. Transportadores de glutamato: EAAT2	48
3.2. REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: MMP-2 Y MMP-9	50
3.3. NEUROGÉNESIS	52
3.3.1. Marcadores de estados de maduración de células en división	53
3.3.2. Moduladores moleculares de neurogénesis	55
3.3.3. Proliferación nerviosa no neuronal	57
<b>4. 3,3'-diindolilmetano</b>	<b>58</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>63</b>
<b>Objetivos</b>	<b>65</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>69</b>

<b>1. Animales de experimentación</b>	<b>69</b>
<b>2. Compuestos administrados</b>	<b>69</b>
<b>3. Diseño experimental</b>	<b>70</b>
3.1. MODELO DE ADMINISTRACIÓN DE ETANOL EN <i>BINGE</i> MÚLTIPLE	70
3.2. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE DIM: ESTUDIOS CONDUCTUALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MEMORIA	71
3.3. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	73
3.3.1. Metabolización del etanol	73
3.3.2. Curso temporal del efecto de DIM sobre las alteraciones producidas por el modelo de <i>binge</i> múltiple en la actividad degradativa de metaloproteasas	74
3.3.3. Curso temporal del efecto de DIM sobre las alteraciones inducidas por el modelo de <i>binge</i> múltiple en los niveles de expresión de proteínas de distintos procesos fisiológicos	74
3.3.4. Estudios sobre neurogénesis y supervivencia neural	76
<b>4. Obtención, procesamiento de muestras y técnicas experimentales</b>	<b>78</b>
4.1. CONDUCTA: TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO	78
4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	79
4.2.1. Plasma sanguíneo	79
4.2.2. Tejido cerebral	80
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SANGRE	80
4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA EN HOMOGENADOS TOTALES	80
4.5. ZIMOGRFÍA Y <i>WESTERN BLOT</i>	81
4.5.1. Procesamiento de hipocampos para la determinación de la actividad enzimática de metaloproteasas por zimografía y de la expresión de proteínas por <i>western blot</i>	81
4.5.2. Procesamiento de hipocampos para el ensayo de biotinilación de superficie de receptores de glutamato	81
4.5.3. Zimografía en gel	82
4.5.4. <i>Western blot</i>	83
4.6. INMUNOHISTOQUÍMICA	86
4.6.1. Procesamiento de cerebros para la obtención de secciones hipocampales	86
4.6.2. Supervivencia de células neurales de nueva formación: colocalización con BrdU	86
4.6.3. Neurogénesis hipocampal: marcaje de neuronas inmaduras	87
<b>5. Análisis estadístico</b>	<b>89</b>
<b>Resultados</b>	<b>93</b>
<b>1. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el <i>binge</i> de etanol en la memoria de reconocimiento</b>	<b>93</b>
1.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA MEMORIA A 20 H TRAS LA ÚLTIMA EXPOSICIÓN A ETANOL EN RATONES MACHO Y HEMBRA	93
1.1.1. Determinación de los niveles plasmáticos de etanol en machos y hembras	95
1.1.2. Efecto de DIM en el metabolismo del etanol	96
1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 4 DOSIS DE DIM EN LA MEMORIA A 7 DÍAS TRAS LA ÚLTIMA EXPOSICIÓN A ETANOL	96
<b>2. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el <i>binge</i> de etanol en la expresión de componentes del sistema glutamatérgico</b>	<b>98</b>
2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NMDA	98
2.1.1. Subunidad 2A del receptor NMDA	98

2.1.2.	Subunidad 2B del receptor NMDA	99
2.1.3.	Ratio GluN2A/GluN2B	100
<b>2.2.</b>	<b>EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AMPA</b>	<b>101</b>
2.2.1.	Efecto del tratamiento con DIM sobre el tráfico a membrana del receptor AMPA	102
<b>2.3.</b>	<b>EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR METABOTRÓPICO MGLU2</b>	<b>103</b>
<b>2.4.</b>	<b>EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR EAAT2</b>	<b>104</b>
<b>3.</b>	<b><u>Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el binge de etanol en las metaloproteasas 2 y 9</u></b>	<b><u>105</u></b>
3.1.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE MMP-2	105
3.2.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE MMP-9	106
3.2.1.	Efecto del tratamiento con DIM sobre la actividad proteolítica de MMP-9	106
3.2.2.	Efecto del tratamiento con DIM sobre la expresión de MMP-9	107
<b>4.</b>	<b><u>Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el binge de etanol en la neurogénesis y la supervivencia de células de nueva generación</u></b>	<b><u>108</u></b>
4.1.	ESTUDIO DE COLOCALIZACIÓN DE BRDU CON MARCADORES DE LINAJE CELULAR	109
4.2.	ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE NEURONAS INMADURAS	109
<b>5.</b>	<b><u>Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el binge de etanol en la expresión de mediadores implicados en la ruta de señalización de BDNF</u></b>	<b><u>113</u></b>
5.1.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE BDNF	113
5.2.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TRKB	114
5.2.1.	Forma no glicosilada	114
5.2.2.	Forma glicosilada	115
5.3.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE AKT	116
5.4.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE CREB	117
<b>6.</b>	<b><u>Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el binge de etanol en la expresión de proteínas implicadas en la dinámica fusión-fisión mitocondrial</u></b>	<b><u>118</u></b>
<b>7.</b>	<b><u>Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el binge de etanol en la expresión de proteínas de defensa antioxidante</u></b>	<b><u>118</u></b>
	<b><u>Discusión</u></b>	<b><u>125</u></b>
	<b><u>Conclusiones</u></b>	<b><u>153</u></b>
	<b><u>Conclusions</u></b>	<b><u>155</u></b>
	<b><u>Referencias</u></b>	<b><u>159</u></b>







## LISTA DE ABREVIATURAS

- AhR – Receptor de aril hidrocarburos
- Akt – Proteína kinasa B
- APC – Alcohol *per capita*
- AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
- BDNF – Factor neurotrófico derivado del cerebro
- BrdU – Bromodeoxiuridina
- CREB – Proteína de unión a los elementos respondedores a AMP cíclico
- DCX – Doblecortina
- DIM – 3,3'-diindolilmetano
- DRP-1 – *Dynamin-related protein 1*
- EAAT1-5 – Transportador de aminoácidos excitadores 1-5
- ECM – Matriz extracelular
- EtOH – Etanol
- GluA1/2/(...) – Subunidad 1/2/(...) del receptor AMPA
- GluN1/2A/2B/(...) – Subunidad 1/2A/2B/(...) del receptor NMDA
- HO-1 – Hemooxigenasa 1
- Iba-1 – *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*
- LTD – Depresión a largo plazo
- LTP – Potenciación a largo plazo
- MMP – Metaloproteasa de matriz
- NeuN – *RNA binding protein fox-1 homolog 3 (Rbfox3) / Neuronal nuclei antigen*
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- mGlu(R) – (Receptor) metabotrópico de glutamato
- OMS – Organización Mundial de la Salud
- ROS – Especies reactivas del oxígeno
- SNC – Sistema nervioso central
- TrkB - Receptor de neurotrofina tirosina kinasa B



---

# Resumen

**Abstract**

---



## RESUMEN

El alcohol es la droga de abuso más consumida en el mundo, estimándose que un 5 % de las muertes totales a nivel global están ligadas directa o indirectamente al consumo de esta sustancia adictiva, lo que genera un elevado coste socioeconómico y supone una importante amenaza para los sistemas de salud pública. Los perfiles de consumo difieren en función de diversos aspectos, como la cultura social, el estatus económico, el sexo y la edad. El consumo tipo *binge drinking*, que se define como un consumo abusivo y excesivo de alcohol en un periodo corto de tiempo, es el más practicado por adolescentes y jóvenes adultos, edades altamente susceptibles a los efectos perjudiciales del consumo de alcohol. Es especialmente preocupante que las consecuencias inducidas por el consumo de alcohol en estas etapas tempranas de la vida se pueden perpetuar en la edad adulta y la vejez.

El etanol (EtOH) es el componente psicoactivo presente en las bebidas alcohólicas y el causante de las alteraciones derivadas de su consumo. El sistema nervioso central es muy vulnerable a los efectos ejercidos por esta droga y, en particular, las funciones cognitivas se ven gravemente afectadas. En el cerebro, el hipocampo, área fundamental para el procesamiento de la función cognitiva de memoria, es una de las regiones más sensibles al daño por EtOH. La memoria de reconocimiento es un tipo de memoria explícita que se encarga de la distinción de objetos, experiencias o conceptos novedosos en comparación con los previamente experimentados y resulta de vital importancia para el procesamiento y la actualización de la información del entorno. Numerosos estudios han comprobado que distintos modelos de consumo de EtOH tipo *binge* inducen fallos en el desempeño de pruebas conductuales de memoria de reconocimiento.

Son diversos los mecanismos por los cuales el EtOH es capaz de generar daño cerebral, el cual finalmente se traduce en defectos en la memoria de reconocimiento. En primer lugar, de los sistemas de neurotransmisión implicados en la memoria, el sistema glutamatérgico resulta de especial interés debido a su fundamental implicación en la potenciación y depresión a largo plazo, mecanismos subyacentes a los procesos hipocampales. El EtOH puede interactuar directamente con receptores glutamatérgicos, modificando su actividad cinética, expresión y presencia en la membrana neuronal. Los desequilibrios provocados en la actividad del sistema glutamatérgico afectarán directamente al desempeño de la función de memoria de reconocimiento de objeto. Por

## RESUMEN

otro lado, el EtOH, así como su propio metabolismo, induce la generación de especies reactivas de oxígeno, radicales libres que pueden alterar la estructura celular de las neuronas mediante la interacción con los componentes de la membrana plasmática y, por tanto, la transmisión eléctrica de las sinapsis. La presencia de especies reactivas de oxígeno puede regular la neurogénesis hipocampal adulta. En el cerebro adulto, la proliferación neuronal se puede poner en marcha en respuesta a procesos patológicos o de daño cerebral como mecanismo de defensa y reparación. Se sabe que el EtOH, en distintos patrones de consumo, disminuye la tasa de proliferación neuronal y afecta a la supervivencia de células de nueva generación, impactando directamente en los circuitos hipocampales.

El 3,3'-diindolilmetano (DIM) se ha estudiado ampliamente en multitud de tipos de cáncer por sus propiedades antiproliferativas y antimetastásicas sobre células malignas. Más recientemente, se ha demostrado que DIM posee una naturaleza neuroprotectora en condiciones de daño cerebral. Dado que los mecanismos neuroprotectores de DIM pueden interferir con los procesos patológicos disparados por la exposición a EtOH, establecimos la hipótesis de que el tratamiento con DIM es capaz de prevenir el déficit de memoria de reconocimiento de objeto inducido por la exposición a EtOH mediante un paradigma tipo *binge*. Esta prevención se conseguiría gracias a la modulación de las alteraciones observadas en distintos aspectos que pueden intervenir en el funcionamiento del hipocampo.

Trabajamos con un modelo de *binge* de EtOH en el que los ratones son sometidos a cuatro sesiones de administración intraperitoneal de EtOH. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con cuatro dosis de DIM (50 mg/kg, vía intraperitoneal) previene el déficit de memoria de reconocimiento de objeto inducido por la administración de EtOH tipo *binge* a 20 h tras la última exposición, efecto que desaparece 7 días más tarde. En base a esto, se procedió a analizar los distintos parámetros susceptibles de alteración por la exposición a EtOH que pudieran estar relacionados con el efecto neuroprotector de DIM.

El *binge* de EtOH produce un desequilibrio en la expresión del receptor glutamatérgico NMDA hipocampal, debido a un incremento de la expresión de la subunidad GluN2A. Por su parte, el tratamiento con DIM previene este aumento y devuelve la relación entre las subunidades GluN2A/GluN2B a niveles similares a aquellos en animales control.

Además, DIM aumenta la expresión del transportador astrocítico de glutamato EAAT2 en los animales expuestos a EtOH. Por último, el *binge* de EtOH provoca un aumento de la inserción del receptor AMPA en la membrana neuronal del hipocampo, efecto que no es modulado por DIM.

En cuanto a los procesos de proliferación hipocampal adulta, el *binge* de EtOH evita la maduración de neuronas de nueva generación, que expresan el marcador NeuN, ya que observamos una disminución del número de neuronas maduras nuevas tras la exposición al protocolo de *binge* de EtOH, efecto que no es modificado por DIM. Sin embargo, el tratamiento con DIM sí facilita la supervivencia de neuronas inmaduras que entran en ciclo de división y diferenciación como respuesta a las sucesivas sesiones de *binge*. Los efectos de DIM sobre la supervivencia de neuronas jóvenes no parecen estar relacionados con la señalización por la vía de BDNF, una de las rutas principales reguladoras de proliferación y supervivencia celular. Por otra parte, el *binge* de EtOH también induce un aumento de la microglía activada de nueva generación, proceso ante el que DIM tampoco interviene, mientras que no se observan cambios en los eventos de astrogénesis debidos a ninguno de los dos tratamientos.

Por último, se estudió la actividad de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9, encargadas de la remodelación de la matriz celular necesaria para los eventos plásticos de memoria. La actividad de MMP-9 sufre un aumento por la exposición a EtOH, lo cual se puede relacionar con el déficit de memoria de reconocimiento. A su vez, el tratamiento con DIM previene esta alteración, lo que podría estar asociado a la protección de la memoria. Finalmente, se examinó el nivel de expresión de una serie de enzimas de defensas antioxidantes, en las cuales no se observó ningún tipo de modulación por parte de DIM.

En definitiva, nuestros resultados indican que la prevención del déficit de memoria de reconocimiento producido por el consumo de EtOH que se observa tras el tratamiento con DIM se puede asociar a la modulación de los cambios inducidos por el *binge* de EtOH en componentes del sistema de neurotransmisión glutamatérgica y a la preservación del número de neuronas inmaduras de nueva generación.



## ABSTRACT

Alcohol is the most widely consumed drug of abuse worldwide, with an estimated 5 % of all deaths globally being directly or indirectly linked to the use of this addictive substance, generating a high socioeconomic cost and posing a major threat to public health systems. Consumption profiles differ according to various aspects, such as social culture, economic status, sex and age. Binge drinking, which is defined as an abusive and excessive alcohol consumption in a short period of time, is most commonly practiced by adolescents and young adults, ages that are highly susceptible to the harmful effects of alcohol consumption. Of particular concern is the fact that the consequences induced by alcohol consumption in these early stages of life can be perpetuated into adulthood and old age.

Ethanol (EtOH) is the psychoactive component of alcoholic beverages and the cause of the alterations resulting from its consumption. The central nervous system is very vulnerable to the effects exerted by this drug and, in particular, cognitive functions are severely affected. In the brain, the hippocampus, a fundamental area for the processing of the cognitive function of memory, is one of the most sensitive regions to EtOH damage. Recognition memory is a type of explicit memory that is responsible for distinguishing novel objects, experiences or concepts from those previously experienced and is of vital importance for processing and updating information from the environment. Numerous studies have shown that different binge-like EtOH consumption patterns induce failures in the performance of behavioral tests of recognition memory.

There are several mechanisms by which EtOH is able to generate brain damage, which ultimately results in defects in recognition memory. First, among the neurotransmitter systems involved in memory, the glutamatergic system is of special interest because of its fundamental involvement in long-term potentiation and depression, mechanisms underlying hippocampal processes. EtOH can interact directly with glutamatergic receptors, modifying their kinetic activity, expression and presence in the neuronal membrane. Imbalances caused in the activity of the glutamatergic system will directly affect the performance of object recognition memory function. On the other hand, EtOH, as well as its own metabolism, induces the generation of reactive oxygen species, free radicals that can alter the cellular structure of neurons through interaction with plasma

## ABSTRACT

membrane components and, therefore, the electrical transmission of synapses. The presence of reactive oxygen species may regulate adult hippocampal neurogenesis. In the adult brain, neuronal proliferation may be triggered in response to pathological processes or brain damage as a defense and repair mechanism. EtOH, in different consumption patterns, is known to decrease the rate of neuronal proliferation and affect the survival of newly generated cells, directly impacting hippocampal circuitry.

3,3'-diindolylmethane (DIM) has been extensively studied in a multitude of cancers because of its antiproliferative and antimetastatic properties against malignant cells. More recently, DIM has been shown to possess a neuroprotective nature under conditions of brain damage. Given that the neuroprotective strategies of DIM can interfere with the pathological processes triggered by EtOH exposure, we hypothesized that DIM treatment is able to prevent the object recognition memory deficit induced by EtOH exposure following a binge-like paradigm. This prevention is achieved by the modulation of the alterations observed in different aspects involved in hippocampal functioning.

We worked with a binge model in which mice are subjected to four intraperitoneal EtOH administration sessions. Our results show that treatment with four doses of DIM (50 mg/kg, intraperitoneal injection) prevents the object recognition memory deficit induced by EtOH binge administration 20 h after the last exposure, an effect that disappears 7 days later. On this basis, we proceeded to analyze the different parameters susceptible to alteration by EtOH exposure that are related to the neuroprotective effect of DIM.

Binge EtOH produces an imbalance in the expression of the hippocampal glutamatergic NMDA receptor, due to an increase in the expression of the GluN2A subunit. Treatment with DIM prevents this increase and returns the GluN2A/GluN2B subunit ratio to levels observed in control animals. Furthermore, DIM increases the expression of the astrocytic glutamate transporter EAAT2 in EtOH-exposed animals. Finally, EtOH binge causes an increase in AMPA receptor membrane trafficking in the hippocampus neuronal membrane, an effect that is not modulated by DIM.

Regarding adult hippocampal proliferation processes, binge EtOH prevents the maturation of newly generated neurons, expressing the NeuN marker, as we observed a decrease in the number of new mature neurons after exposure to the EtOH binge

protocol, effect that was not modified by DIM. However, DIM treatment does facilitate the survival of immature neurons that enter in the division and differentiation cycle in response to successive binge sessions. The effects of DIM on the survival of young neurons do not appear to be related to signaling through the BDNF pathway, a major regulatory pathway for cell proliferation and survival. On the other hand, EtOH also induces an increase in newly-generated activated microglia, a process to which DIM does not intervene either, while no changes in astrogenesis events due to either treatment are observed.

Finally, the activity of the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9, responsible for the remodeling of the cellular matrix necessary for plastic memory events, was studied. MMP-9 activity is increased by EtOH exposure, which may be related to the recognition memory deficit. In turn, treatment with DIM prevents this alteration, which could be associated with the protection of memory. Finally, the expression level of a series of antioxidant defense enzymes was examined, in which no modulation by DIM was observed.

Ultimately, our results indicate that the prevention of the EtOH induced-recognition memory deficit observed after DIM treatment may be associated with the modulation of binge EtOH-induced changes in components of the glutamatergic neurotransmitter system and with the preservation of the number of newly generated immature neurons.



---

# **Introducción**

---



# INTRODUCCIÓN

## BLOQUE I - Etanol

### 1. El alcohol como droga de abuso

El alcohol es la droga de abuso más consumida en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el consumo de alcohol está implicado en una de cada veinte muertes (5.3 %), lo que se traduce mundialmente en tres millones de defunciones anuales. La ingesta de alcohol conlleva una reducción de la calidad y esperanza de vida, ya que se ha relacionado con más de 200 patologías distintas, pero las consecuencias del uso de esta droga no solo afectan al individuo, sino que también tienen un impacto socioeconómico importante, especialmente sobre los sistemas de salud<sup>1</sup>.

#### 1.1. DATOS Y TENDENCIAS ACTUALES SOBRE EL CONSUMO DE ALCOHOL

Las estadísticas en torno a la problemática del consumo de alcohol son preocupantes. En su último informe, la OMS ha declarado que el 7.2 % de muertes prematuras acontecidas en 2016 estaban causadas por el alcohol y que el número de muertes atribuibles al consumo de alcohol es mayor que el de enfermedades como la diabetes, el SIDA o la tuberculosis. Además, hay diferencias entre sexos: los hombres acaparan alrededor del 70 % de las muertes ocasionadas por la ingesta de alcohol y más del 80 % de los casos de desorden por uso de alcohol diagnosticados. A pesar del conocimiento de todos estos riesgos, el consumo de esta droga está muy extendido y socialmente aceptado desde hace siglos, especialmente, en las culturas occidentales, lo que, junto a su estatus de legalidad en la mayor parte del mundo, supone uno de los mayores retos de salud pública a los que se enfrenta la sociedad actual<sup>1</sup>.

Distintos factores perfilan las tendencias de consumo de alcohol y, con ello, la severidad de los problemas derivados del uso de esta sustancia. El estatus económico, las normas socioculturales y religiosas y la existencia de políticas gubernamentales de monitorización del uso de alcohol son algunos de los factores sociales que influyen en los niveles de consumo de alcohol de un país. De esta manera, la mayor parte de casos de trastorno por consumo de alcohol se diagnostican en países de renta alta. En línea con esto, la Región Europea de la OMS es la que mayor tasa de consumo de alcohol *per capita*

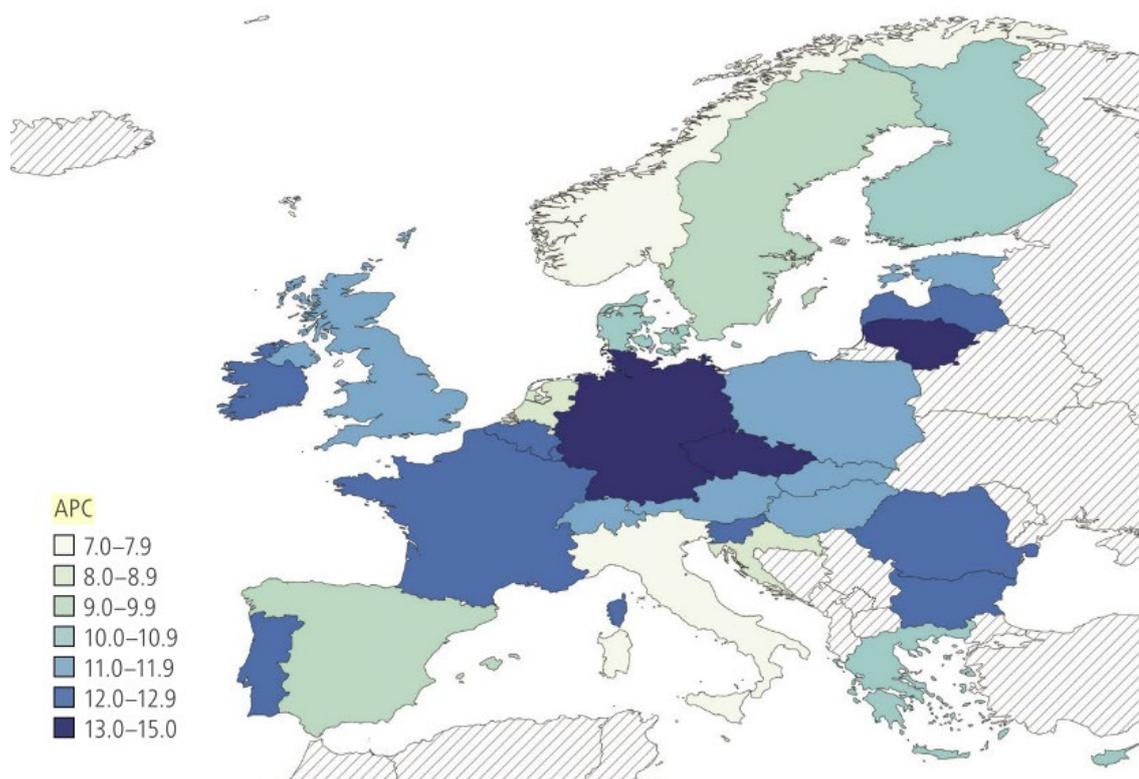
## INTRODUCCIÓN

(APC) presenta, tanto en población general como en adolescente, con más de 10 L en algunos países de la zona; mientras que en el otro extremo encontramos a la Región del Mediterráneo Oriental, formada por una mayoría de países musulmanes, cuyo APC no supera los 2.5 L. Por otro lado, tenemos los factores individuales, entre los cuales son relevantes la edad, el sexo, la situación sociofamiliar y el estatus económico. Por ejemplo, en 2016, el APC mundial para los hombres y mujeres fue 19.4 y 7 L de alcohol puro, respectivamente. La combinación de ambos tipos de factores determinará la probabilidad de desarrollar conductas de dependencia a alcohol<sup>1,2</sup>.

En cuanto a los datos en España, el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) desveló en su encuesta de 2021 que, en el transcurso de los años 2019-2020, más del 77 % de la población general encuestada entre 15 y 64 años afirmó haber consumido alcohol en, al menos, una ocasión en el último año. El consumo en los últimos 30 días obtuvo una prevalencia del 63 %, mientras que la del consumo diario alcanzó el 8.8 %<sup>3</sup>. Curiosamente, en el tramo de edad de mayores de 64 años, la tasa de consumo diario de alcohol fue más de 2 veces superior al de la población general, situándose en un 19 %<sup>4</sup>. Por sexo, el consumo diario de alcohol fue practicado por un 14.2 % de los hombres, porcentaje que cuatriplica al de mujeres (3.4 %). Además, también hay diferencia en la edad de comienzo de consumo, ya que los hombres se inician a los 15.9 años y las mujeres, a los 17.3, y en la incidencia de intoxicaciones etílicas agudas, más comunes en hombres<sup>3</sup>. En 2020, un 34.2 % de las admisiones a tratamiento ambulatorio fueron por abuso o dependencia a alcohol, el cual, además, se encontró en un buen número de casos de policonsumo<sup>5</sup>. Más aún, se define como patrón de consumo de riesgo aquel que incrementa la probabilidad de sufrir consecuencias negativas o de comportamientos que deriven en dependencia al alcohol, los cuales son más frecuentes en los estratos más jóvenes, disminuyendo conforme avanza la edad. La Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) del OEDA, que se lleva realizando desde 1995, reveló en su último informe que, en 2020, más de un millón y medio de personas practican un patrón de consumo de alcohol de riesgo. De este millón y medio, aproximadamente dos tercios son hombres, los cuales, además, también son más proclives a desarrollar dependencia al alcohol<sup>6</sup>.

Colocando a España en el contexto continental, la Oficina Regional de Europa de la OMS reveló, en su informe de 2019, que los países mediterráneos (Portugal, Italia, Malta,

Grecia, Chipre y España) son los que presentan una menor tasa de consumo excesivo episódico de alcohol (esto es, ingesta de al menos 60 g de alcohol puro en una única ocasión) y menor proporción de muertes atribuibles al alcohol, hallándose por debajo de la media de la Unión Europea. La misma tendencia se observó para el APC (Fig. 1), además de que, entre 2010 y 2016, los países mediterráneos, a excepción de Portugal y junto con los nórdicos Noruega y Suecia, mostraron un descenso en este parámetro<sup>7</sup>.



**Figura 1.** APC en adultos (>15 años) en los países de la Unión Europea en 2016. Se puede observar una clara tendencia de menor consumo de alcohol en los países del Mediterráneo y en los países nórdicos, mientras que el cinturón central de Europa muestra los niveles más altos de ingesta de alcohol. Imagen tomada de “*Status report on alcohol consumption, harm and policy responses in 30 European countries*” de la Oficina Regional de Europa de la OMS<sup>7</sup>.

## 1.2. IMPACTO DEL CONSUMO DE ALCOHOL SOBRE LA SALUD

El abuso de alcohol está asociado, como ya se ha mencionado, con el desarrollo de numerosas patologías en múltiples sistemas del organismo<sup>1</sup>. Entre ellas, en primer lugar, encontramos el trastorno por uso de alcohol, llamado también coloquialmente alcoholismo, enfermedad crónica caracterizada por la dependencia física y mental al alcohol derivada del uso compulsivo de la droga, lo cual acarrea pérdida del control conductual y la aparición de tolerancia y síntomas de abstinencia, incluyendo ansiedad,

## INTRODUCCIÓN

insomnio, episodios depresivos o convulsiones<sup>8</sup>. Además, el consumo de alcohol suele abrir el camino y acompaña frecuentemente al uso de otras drogas, lo que da lugar a politoxicomanías (poliadicción o uso de sustancias múltiples), con consecuencias agudas y crónicas más graves debido a la interacción entre sustancias o al riesgo de sobredosis<sup>9</sup>. Otras enfermedades importantes que destacan pueden ser la cirrosis hepática, el síndrome de Korsakoff, diversos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares o el síndrome alcohólico fetal, que aparece tras el consumo de alcohol durante el embarazo y deriva en complicaciones prenatales y daños neurológicos y de desarrollo irreversibles en el niño<sup>10</sup>. También se ha encontrado una relación de causalidad entre el uso de alcohol y la incidencia de enfermedades infecciosas y de transmisión sexual. Asimismo, la morbilidad debida a la ingesta de esta droga no solo recae en patologías clínicas, sino que también es responsable de traumatismos debido a accidentes, especialmente de tráfico, aumento de la violencia o mayor recurrencia de suicidios<sup>1</sup>. Todo esto da cuenta del profundo impacto que el consumo compulsivo o abusivo de alcohol genera en la sociedad actual.

### 1.3. PATRONES DE CONSUMO DE ALCOHOL

Al igual que ocurre con los tipos de bebidas alcohólicas de preferencia o los niveles de ingesta, los patrones de consumo de alcohol también varían según la cultura o la región geográfica. La creación de políticas de prevención del consumo de alcohol ha llevado a la definición de los niveles de consumo que se consideran de riesgo o dañinos. El Instituto Nacional sobre el Abuso del Alcohol y Alcoholismo (NIAAA) de Estados Unidos define el consumo de bajo riesgo como 3 bebidas o menos en un mismo día y menos de 7 en una semana para mujeres o 4 bebidas o menos en un mismo día y menos de 14 en una semana para hombres<sup>11</sup>. El *binge drinking*, o consumo intensivo o por atracón, se caracteriza por la ingesta de grandes cantidades de alcohol en un periodo corto de tiempo y que frecuentemente se acompaña de una intoxicación alcohólica. El NIAAA lo define como un patrón de consumo dañino que eleva la concentración de alcohol en sangre a 80 mg/dL o niveles superiores, lo cual conlleva la ingesta de 4 o 5 bebidas alcohólicas para mujeres u hombres, respectivamente, en una ventana de tiempo de 2 h<sup>12</sup>. Cuando se superan estos umbrales por sexo por 2 o más veces (es decir, en el mismo tiempo, 8 o más bebidas para mujeres o 10 o más en el caso de hombres), se categoriza como *binge drinking* extremo. Más aún, si se practica *binge drinking* en 5 o más ocasiones en los últimos 30 días, el

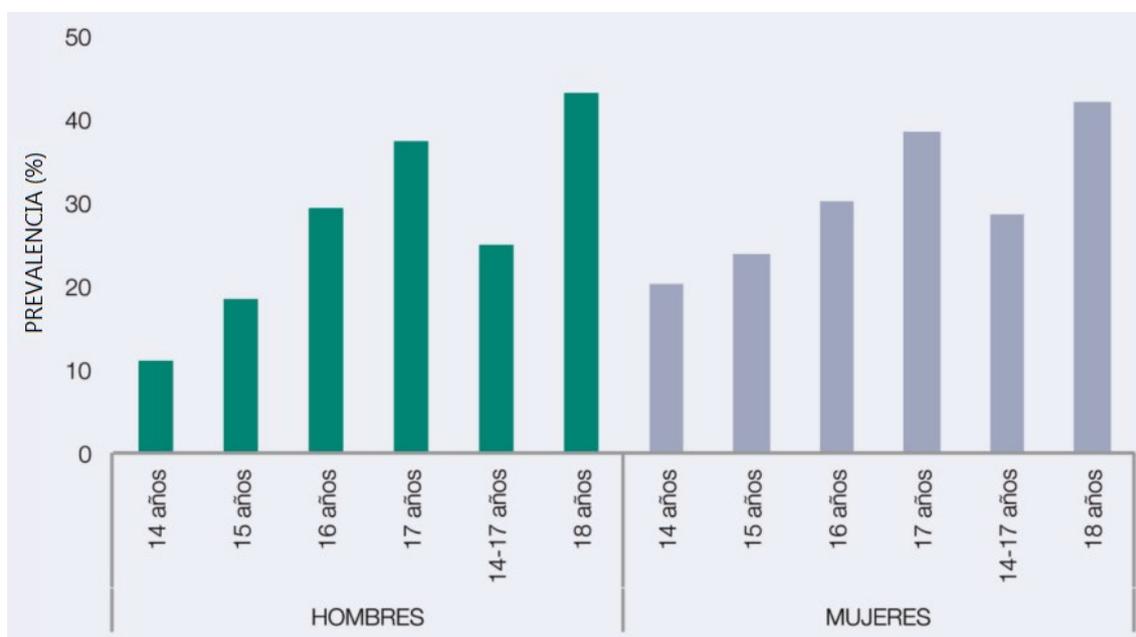
consumo pasa a denominarse *heavy drinking*<sup>11,13</sup>. Por último, la cronificación del consumo de alcohol puede precipitar la transición entre el consumo controlado y el desarrollo de dependencia clínica o trastorno por uso de alcohol, una patología mental que surge de la imposibilidad de controlar la ingesta de alcohol, incluso tras la aparición de síntomas o problemas. Según la 5ª Edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), este trastorno se puede definir como leve, moderado o grave según una lista de criterios que evalúan, por ejemplo, los niveles, la frecuencia o el deseo de consumo<sup>8</sup>. Los patrones de ingesta de alcohol varían según los grupos de edad: los jóvenes tienden a beber con menos frecuencia que los adultos pero ingieren mayores cantidades por ocasión, lo que supone una práctica de tipo *binge drinking*; por su parte, los adultos suelen seguir un patrón de consumo crónico, con cantidades inferiores pero más regularmente. Así pues, esto da lugar a la aparición de consecuencias diferentes en el organismo<sup>13</sup>.

### 1.3.1. Datos estadísticos sobre el consumo tipo *binge drinking*

El consumo tipo *binge drinking* es muy popular entre adolescentes, especialmente con la práctica del denominado “botellón”. El abuso de alcohol durante la adolescencia es preocupante por ser un periodo clave del neurodesarrollo y porque los efectos ejercidos por el alcohol a estas edades pueden permanecer y ser patentes a largo plazo<sup>14</sup>. Se sabe que el *binge drinking* daña las funciones cognitivas, la respuesta motivacional y el procesamiento de estímulos sociales y emocionales, así como incrementa el riesgo de sufrir trastornos mentales<sup>13,15,16</sup>. A través de los últimos datos de la Encuesta sobre uso de drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES) de 2022, que se realiza a adolescentes entre 14 y 18 años, sabemos que un 27.9 % de los adolescentes afirmó haber practicado *binge drinking* en el último mes, así como que un 23.2 % experimentó alguna borrachera en el mismo periodo. Un 53.6 % dijo haber bebido en el último mes, proporción que ha perdido 15 puntos desde 2014 (68.2 %). Además, la edad de inicio en el consumo de alcohol se posiciona en los 14 años para ambos sexos y es a los 15 cuando comienzan el consumo semanal. Una tendencia interesante es la observada en la prevalencia de consumo según el sexo de los estudiantes, en la que se ve que, desde 1996, las chicas entre 14 y 18 años llevan mostrando cifras superiores a las de los chicos tanto en consumo en los últimos 12 meses como en los últimos 30 días, siendo en 2021 cuando

## INTRODUCCIÓN

se ha alcanzado una mayor diferencia entre sexos para ambos datos. También, en los grupos de edad más tempranos, las chicas reconocen haber sufrido una intoxicación etílica aguda en mayor medida que los chicos. En cuanto a la prevalencia de las mencionadas intoxicaciones, o borracheras, casi un 12 % de los estudiantes de 14 años admite haberse emborrachado en el último mes y este dato va incrementándose paulatinamente hasta triplicarse para el grupo de los 18 años (Fig. 2)<sup>17</sup>. Esta subida progresiva no se queda ahí, ya que diversos sondeos han revelado que el mayor pico de consumo de alcohol tipo *binge drinking* se da sobre los 25 años, es decir, durante la adultez temprana. En la Encuesta Nacional sobre el Uso de Drogas y Salud de 2020 de la Administración de Servicios de Abuso de Sustancias y Salud Mental (SAMHSA) de Estados Unidos, los adultos jóvenes en el grupo entre 18 y 25 años mostraron el mayor porcentaje de *binge drinking* de todos los estratos de edad, con un 31.4 % y más de 10 millones de personas, seguido de adultos de 26 en adelante<sup>18,19</sup>. Con todo esto, la presente Tesis Doctoral utilizó un modelo de consumo forzado que entraría en la definición de *binge* extremo, ya que así se consiguen, de forma controlada, concentraciones plasmáticas de alcohol más elevadas, emulando el tipo de consumo más habitual entre los jóvenes adultos.



**Figura 2.** Prevalencia, en porcentaje, del consumo tipo *binge drinking* en los últimos 30 días según sexo y edad entre los estudiantes de Enseñanzas Secundarias de España en 2021. Imagen tomada de la encuesta “ESTUDES” del OEDA de 2022<sup>17</sup>.

## 2. Etanol

El etanol (EtOH), también denominado alcohol etílico, es la sustancia responsable de los efectos psicoactivos y adictivos del alcohol. Una bebida alcohólica, por tanto, es aquella que tiene como ingrediente principal el EtOH. Existen dos grandes grupos de bebidas alcohólicas: las fermentadas, como la cerveza o el vino, procedentes de frutas y cereales; y las destiladas, como los licores, con una proporción mayor de EtOH. Por ley, los envases de bebidas alcohólicas deben indicar en su etiquetado la graduación alcohólica, es decir, el porcentaje de volumen de EtOH puro en el producto. No obstante, en el ámbito sanitario es más indicativo expresar los gramos de EtOH absoluto consumidos, el cual se obtiene a partir de la relación entre el volumen de bebida ingerida, la graduación alcohólica y la densidad del EtOH<sup>2</sup>.

### 2.1. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN Y METABOLISMO DEL ETANOL

Por vía oral, el EtOH contenido en las bebidas alcohólicas llega hasta la sangre a través del lumen del tracto gastrointestinal. El EtOH es capaz de atravesar las membranas celulares y por difusión pasiva llega al torrente sanguíneo atravesando capilares. La mayor parte del EtOH se absorbe en el intestino con lo que la tasa de vaciado gástrico es determinante en la tasa de absorción del EtOH, la cual se verá afectada por factores como la presencia de alimentos en el estómago, la acidez del jugo gástrico o el tratamiento con fármacos que modifiquen parámetros como la motilidad gastrointestinal. Es importante tener en cuenta que el EtOH sufre un fuerte metabolismo de primer paso en la mucosa gástrica, pero, aun así, se alcanza el equilibrio en la sangre de manera muy rápida, en la que se detecta tan solo 5 min después de la ingesta y alcanza concentraciones máximas entre los 30 y 90 min<sup>20-22</sup>.

En su transporte por el torrente sanguíneo, el EtOH no se une a proteínas plasmáticas, lo que facilita su difusión a otros órganos. Además, gracias a su hidrosolubilidad y al pequeño tamaño de su molécula, el EtOH atraviesa la barrera hematoencefálica, así como la placentaria. Con todo esto, y dada su alta vascularización, el sistema nervioso central (SNC) es de las regiones que más rápidamente sufre las acciones de la exposición a EtOH, las cuales se describirán en más detalle en secciones posteriores. Otros órganos en los que los efectos del EtOH no tardan en aparecer son el hígado, el corazón y los riñones<sup>23</sup>. Además, el hígado tiene un papel prominente en el metabolismo del EtOH, ya que

## INTRODUCCIÓN

alrededor del 90 % de la degradación de esta sustancia se produce por oxidación hepática. Existen otras vías de degradación del EtOH por metabolismo no oxidativo, de aportación minoritaria, que incluyen la glucuronidación, sulfatación y formación de ésteres etílicos de ácidos grasos<sup>24</sup>. Los metabolitos generados en estas rutas se relacionan con el daño mitocondrial inducido por la exposición a EtOH<sup>25</sup>.

El metabolismo oxidativo hepático da lugar a la degradación del EtOH a acetaldehído, además de la reducción de NAD<sup>+</sup> en NADH como subproducto. Hay tres enzimas que pueden catalizar esta reacción, siendo la principal la alcohol deshidrogenasa. Se trata de una enzima que se expresa de manera predominante en los hepatocitos, aunque también cuenta con una forma gástrica cuya relevancia metabólica es menor. La alcohol deshidrogenasa está formada por 7 subunidades cuyo ensamblaje puede dar lugar a 5 isoformas, de las cuales la 1 y la 2 contribuyen mayormente a la metabolización del EtOH<sup>26</sup>. Las variantes alélicas de los genes que codifican estas isoformas pueden alterar las propiedades cinéticas de la enzima, influyendo así en el metabolismo del EtOH y, con ello, en las repercusiones de su consumo<sup>13</sup>.

El paso de EtOH a acetaldehído puede también estar dirigido por el sistema microsomal de oxidación del EtOH, que involucra a la familia de los citocromos P450, especialmente al CYP2E1<sup>24</sup>. Esta ruta es responsable de aproximadamente el 10 % de la oxidación del EtOH pero cobra especial relevancia en situaciones de altas concentraciones de EtOH y tras el consumo crónico en personas dependientes, ya que, en este contexto, el citocromo CYP2E1 puede aumentar notablemente su expresión. Este sistema utiliza NADPH y oxígeno para el catabolismo del EtOH en acetaldehído, lo cual genera gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), como por ejemplo, peróxido de hidrógeno, anión superóxido o radicales hidroxilo, claves en la fisiopatología del EtOH<sup>22,27</sup>. Otra característica importante de este sistema es que el EtOH impide la degradación del CYP2E1, con lo que influye en su propio metabolismo y este es un mecanismo que se cree implicado en el desarrollo de la tolerancia a EtOH observada en pacientes crónicos. Por último, la tercera enzima responsable del metabolismo del EtOH a acetaldehído sería la catalasa peroxisomal, cuyo rol en el hepatocito es mucho menor que el de la dos anteriores. Sin embargo, en el cerebro, donde la alcohol deshidrogenasa no es muy activa, la catalasa adquiere mayor relevancia, estando incluso asociada a la generación del refuerzo positivo del EtOH<sup>24</sup>.

El acetaldehído es un compuesto altamente tóxico, por lo que rápidamente se procesa en la mitocondria de nuevo por oxidación dando lugar a acetato, reacción catalizada por la enzima aldehído deshidrogenasa<sup>26</sup>. Esta enzima también presenta varias isoformas que se ubican en distintos compartimentos celulares y cuya diversidad genotípica influye en el metabolismo del EtOH. La variante genética más conocida es ALDH2\*2, común en personas de ascendencia asiática oriental y causante del efecto conocido como rubor asiático (enrojecimiento de la piel tras el consumo de alcohol). Esta variante de la isoforma 2 posee un grado de actividad muy bajo, de manera que no se produce el paso de acetaldehído a acetato. Consecuentemente, el acetaldehído incrementa su concentración en sangre, originando una reacción aversiva consistente en enrojecimiento dérmico, náuseas y taquicardia. Esta reacción se conoce como efecto antabús, por el nombre comercial del fármaco disulfiram, aprobado para el tratamiento de la dependencia a EtOH y cuyo mecanismo de acción se asemeja al de esta variante genética. Finalmente, el acetato generado puede reciclarse en sustratos para otros procesos metabólicos, siendo el más relevante la acetil coenzima A<sup>13,24,28</sup>.

## 2.2. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE EL ORGANISMO

El EtOH ejerce efectos tóxicos sobre la mayoría de sistemas del organismo y, de entre ellos, las alteraciones en el SNC son las más notables. Para perfilar las múltiples dianas del EtOH en el organismo, enumeraremos algunos de los efectos sistémicos y, a continuación, entraremos en más detalle en las acciones del EtOH en el SNC.

### 2.2.1. Efectos sistémicos

El EtOH reduce los niveles de glucosa en sangre por inhibición de la gluconeogénesis, como consecuencia de su metabolismo hepático, lo que reduce la ratio piruvato/lactato<sup>29</sup>. En el sistema hormonal, el EtOH inhibe la liberación de vasopresina, perdiéndose su efecto antidiurético, lo que, unido a la inducción del vómito, favorece la deshidratación<sup>30</sup>. Además, la producción y el metabolismo de hormonas sexuales también se ve alterado, lo que genera problemas de fertilidad. El aumento de estrógenos y la disminución de testosterona en el hombre derivados del consumo de EtOH produce una reducción de la calidad del esperma y disfunción eréctil y eyaculatoria<sup>31-33</sup>. El sistema cardiovascular también es una diana importante del EtOH y sus efectos varían según el tipo de consumo.

## INTRODUCCIÓN

En consumo agudo se puede observar una vasodilatación importante por la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa, mientras que el uso crónico de EtOH causa hipertensión y aumento de la concentración de colesterol LDL, lo que acentúa el daño al músculo cardíaco y el desarrollo de cardiomiopatías. Los episodios de *heavy drinking* se han relacionado con la aparición de arritmias temporales, asociadas al aumento de la dispersión del intervalo QT<sup>34</sup>. Los trastornos por uso de EtOH duplican la probabilidad de sufrir diversos tipos de cáncer, como de cabeza y cuello, esofagal o mama<sup>35</sup>. El sistema gastrointestinal presenta numerosas patologías relacionadas con la exposición a EtOH, como hemorragias y úlceras gástricas, pancreatitis, hepatopatía alcohólica (hígado graso) o cirrosis<sup>36</sup>. El EtOH produce, por ejemplo, una hiperactivación de los mastocitos gástricos, generando un microambiente proinflamatorio<sup>37</sup>. Así mismo numerosas evidencias relacionan el consumo de EtOH y la alteración de la microbiota intestinal<sup>38,39</sup>. Más aún, el uso de EtOH puede agravar o empeorar el curso de enfermedades preexistentes, como la diabetes, la hepatitis o el SIDA<sup>10,40</sup>. Las enfermedades infecciosas, además, se pueden ver agravadas por la disfunción del sistema inmune inducida por el EtOH, dado que puede disminuir los sistemas de producción de células sanguíneas o linfáticas, incluyendo leucocitos y plaquetas. Esto, por tanto, propicia la aparición de infecciones oportunistas<sup>41</sup>.

### 2.2.2. Efectos en el sistema nervioso central

El EtOH se considera un depresor nervioso, mayormente por sus efectos sobre la neurotransmisión GABAérgica, pero sus acciones muestran una naturaleza bifásica<sup>42</sup>. En los primeros momentos de la intoxicación, cuando la concentración de EtOH en sangre aún no alcanza la definición de *binge drinking* (es decir, por debajo de 80 mg/dL), el EtOH se comporta como un estimulador nervioso, de manera que ejerce efectos ansiolíticos, favorece la desinhibición y espontaneidad e incrementa los sentimientos de sociabilidad y euforia. Posteriormente, comienzan a aparecer signos de disminución del control motor fino y las funciones cognitivas, como la capacidad de concentración, empiezan a declinar. El aumento de las concentraciones plasmáticas de EtOH por encima del umbral de *binge drinking* (>100 mg/dL) se revela con un manifiesto daño en las habilidades cognitivas y obstaculización de las funciones sensorimotoras. A medida que progresa el aumento de los niveles plasmáticos de EtOH, se van sucediendo claros signos de una gradual

depresión central, incluyendo fallos en el discurso, descoordinación motora, pérdida de reflejos, somnolencia y bajo ritmo de respiración<sup>43</sup>. A concentraciones superiores a los 400 mg/dL, el riesgo de pérdida de consciencia o coma, depresión respiratoria grave u otras complicaciones puede resultar letal<sup>21,44</sup>.

Cuando la exposición a EtOH se mantiene a largo plazo, se desarrollan los fenómenos de tolerancia y dependencia, de manera que los efectos anteriormente mencionados se ven alterados como consecuencia de la adaptación del organismo a la cronificación del estímulo de la droga. El consumo crónico de EtOH afecta a la salud mental impactando en el estado de ánimo. El mantenimiento sostenido del estímulo inhibitorio GABAérgico sobre el SNC genera trastornos mentales como depresión clínica o psicosis. El sueño también es diana de los efectos crónicos del EtOH, produciéndose una alteración de las fases del sueño, así como de la conciliación y despertar. Las habilidades cognitivas muestran claros déficits en diversas funciones, como memoria, velocidad de procesamiento o destreza lingüística<sup>21,45</sup>.

### 2.3. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DAÑO CEREBRAL DEL ETANOL

Como se ha mencionado anteriormente, el EtOH es capaz de alcanzar el SNC gracias a las propiedades químicas de la propia molécula. En el cerebro, el EtOH interactúa con una amplia variedad de sistemas de neurotransmisión y en diferentes regiones cerebrales<sup>21</sup>. La señalización glutamatérgica, GABAérgica, serotoninérgica y colinérgica están bajo el espectro de dianas moleculares directas del EtOH, de igual modo que otras proteínas, como los canales de K<sup>+</sup> de alta conductancia dependientes de Ca<sup>2+</sup> (canal BK, del inglés, *big potassium*) o los canales de K<sup>+</sup> rectificadores internos acoplados a proteína G (canal GIRK, del inglés, *G-protein-coupled inward rectifying K<sup>+</sup> channel*), o señalizadores intracelulares, como la quinasa C o la adenilato ciclasa<sup>21,46,47</sup>. Además, el EtOH puede influir en la actividad de otros circuitos neuronales o factores neuromoduladores, aunque no posean un sitio de unión específico, como es el caso de la señalización dopaminérgica, el sistema endocannabinoide o el factor liberador de corticotropina<sup>47</sup>. Asimismo, también se han revelado alteraciones estructurales en la arquitectura cerebral, tanto a nivel macroscópico como celular<sup>48,49</sup>. Estas estrategias no son excluyentes y su sinergia genera el cuadro general de daño por EtOH. A continuación, incidiremos en los mecanismos de daño más relevantes para esta Tesis Doctoral.

### 2.3.1. Inhibición de receptores ionotrópicos glutamatérgicos

El EtOH posee propiedades inhibitorias sobre los receptores ionotrópicos de glutamato, lo que disminuye la excitabilidad en numerosas áreas cerebrales. El caso más estudiado es el del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), que se convirtió en una de las dianas clásicas del EtOH cuando se describió por primera vez su interacción con el EtOH a finales de los años 80<sup>50</sup>. La administración aguda de EtOH bloquea las corrientes iónicas que pasan a través del canal, reduciendo las respuestas sinápticas mediadas por los receptores NMDA<sup>51</sup>. Por su parte, la exposición crónica a EtOH provoca un aumento de la sensibilidad de los receptores NMDA, lo que a su vez incrementa los eventos excitotóxicos<sup>52</sup>. El segundo tipo de receptor ionotrópico, el receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), también puede ser inhibido por la exposición a EtOH a concentraciones bajas, aunque esta inhibición es menor que la producida en los receptores NMDA<sup>51</sup>. Además, al igual que en los receptores NMDA, la sensibilidad de los receptores AMPA depende del perfil de subunidades<sup>51,53</sup>. Por último, el receptor de kainato no se ha estudiado de manera tan exhaustiva como los otros dos ionotrópicos y no se ha esclarecido totalmente el mecanismo de inhibición utilizado por el EtOH. Sin embargo, el bloqueo del receptor de kainato parece estar implicado en las acciones ansiolíticas y en el efecto excitador inicial del EtOH<sup>47,54</sup>. La excitotoxicidad glutamatérgica es uno de los mecanismos de daño cerebral más relevantes, tanto en abuso de drogas como otras patologías, y el estado hiperglutamatérgico contribuye al desarrollo de conductas de dependencia a alcohol mediante la activación de circuitos implicados en la búsqueda de alcohol<sup>55-57</sup>.

### 2.3.2. Alteración de la plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la capacidad que tienen las conexiones neurales del cerebro para reorganizarse a nivel morfológico y funcional en respuesta a cambios en la actividad neuronal como respuesta adaptativa ante un estímulo del entorno. La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) son dos formas de plasticidad sináptica que rigen la estabilización de sinapsis, en función de la carga de estimulación que reciban<sup>58</sup>. Esta propiedad de remodelación de circuitos neuronales, además de ser una de las bases de los procesos de memoria, conforma uno de los puntos clave en el desarrollo de la dependencia a drogas, ya que la dependencia a sustancias adictivas se genera por la

inducción de cambios duraderos en circuitos cerebrales implicados en la búsqueda de la droga, especialmente en los circuitos corticomesolímbicos encargados del procesamiento de la recompensa<sup>59-61</sup>. La exposición a EtOH altera los eventos de LTP y LTD, influyendo así en los procesos de aprendizaje y memoria. No obstante, el efecto del EtOH en estos mecanismos cognitivos varía notablemente dependiendo de distintos factores, como la edad, la región cerebral o los estímulos inductores<sup>51</sup>.

Tanto la LTP como la LTD dependen de la activación repetida de aferencias en la neurona postsináptica en cuestión. Ambos eventos están fuertemente regidos por los receptores NMDA y AMPA, por lo que la alteración de estos procesos de plasticidad puede ser provocada como consecuencia de la interferencia del EtOH con la señalización glutamatérgica<sup>62,63</sup>. En general, la exposición aguda a concentraciones tóxicas de EtOH abole los eventos de LTP, mientras que la LTD se ve potenciada, aunque los efectos sobre esta última no se conocen tanto<sup>51</sup>. Por su parte, el consumo crónico puede generar efectos distintos a los observados tras la exposición aguda, de manera que se ha demostrado, por ejemplo, una reducción de la LTD dependiente de receptores NMDA en hipocampo, mientras que, en la corteza prefrontal y en el estriado, la LTP dependiente de receptores NMDA se ve facilitada<sup>47</sup>. Por otro lado, se sabe que no solo los receptores ionotrópicos están relacionados con estos fenómenos, sino que algunos de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) también parecen tener una implicación, como ocurre en las células cerebelares de Purkinje, en las cuales la activación de receptores mGlu da lugar a la internalización de receptores AMPA de la membrana postsináptica, dando lugar a una depresión de la fuerza sináptica en esa conexión<sup>64</sup>.

### 2.3.3. Remodelación de la matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) es un entramado formado por macromoléculas (esencialmente, proteínas y glicanos, como fibronectina, laminina o colágeno) que funcionan como soporte físico para las células de un órgano, favoreciendo la integridad del tejido, y como superficie de difusión para neurotransmisores y otros factores, como medio de comunicación entre células<sup>65</sup>. En el SNC, encontramos, además, las redes perineuronales, que son una especialización de la ECM muy importante para los mecanismos de neuroplasticidad, por ejemplo, mediante el control de la inserción de

## INTRODUCCIÓN

receptores y canales iónicos en la membrana sináptica o mediante la presentación de moléculas señalizadoras<sup>66,67</sup>.

Ante estímulos fisiológicos, patológicos o de aprendizaje, la ECM puede ser modificada como mecanismo de respuesta adaptativa. Dada su capacidad para transformar la estructura de un tejido, la remodelación de la ECM cumple un rol central en el funcionamiento de la memoria mediante la facilitación de nuevas conexiones o la desestabilización de sinapsis preexistentes según los fenómenos de LTP y LTD<sup>67</sup>. Diversos estudios han comprobado que la exposición a EtOH desregula la composición de la ECM e incrementa los entramados de redes perineuronales en ciertas áreas cerebrales, lo que induce pérdida de la función de la matriz y neurodegeneración, así como provee un mecanismo para los cambios estructurales inducidos por el EtOH que contribuyen a la aparición de conductas adictivas<sup>66,68</sup>.

La modificación de la ECM es llevada a cabo por enzimas capaces de degradar las macromoléculas integradoras de la matriz. Entre estas proteasas encontramos las metaloproteasas de matriz (MMP), que se clasifican por familias según el sustrato que degradan<sup>69</sup>. En el cerebro podemos hallar varios tipos, que se activarán en respuesta a multitud de estímulos, incluyendo aumento de la actividad neural o daño tisular. Entre ellas, la MMP-9 es la que más atención ha recibido por su participación en plasticidad sináptica. En el hipocampo, por ejemplo, la actividad de MMP-9 está directamente relacionada con déficits en aprendizaje y alteraciones en LTP<sup>70-72</sup>.

### **2.3.4. Inducción de estrés oxidativo y daño mitocondrial**

Como ya se ha descrito anteriormente, el estrés oxidativo producido por el consumo de EtOH es consecuencia del propio metabolismo de la droga. La generación de ROS, especialmente por el procesamiento hepático y por la ruta peroxisomal del CYP2E1, dispara otras respuestas y rutas celulares, como activación de citocromos y señales proinflamatorias o cascadas de señalización mitocondrial<sup>73</sup>. Las ROS son capaces de interactuar con una amplia gama de macromoléculas, modificando su estructura química y, por tanto, alterando sus propiedades y su función fisiológica. Un ejemplo clásico de las acciones de las ROS inducidas por EtOH es la peroxidación lipídica. Los fosfolípidos de las membranas celulares expuestos a ROS cambian su conformación estructural haciendo que la membrana plasmática pierda sus propiedades naturales. La peroxidación lipídica

da lugar a subproductos que también ejercen acciones perjudiciales y que se han asociado a disminución de la viabilidad celular<sup>74</sup>.

Al mismo tiempo, las ROS van a provocar un desbalance en las defensas antioxidantes de las células. El organismo cuenta con una serie de enzimas encargadas de eliminar el exceso de ROS mediante su transformación en moléculas benignas, como agua u oxígeno molecular, o devolviéndolas a un estado reducido, a costa de oxidarse ellas mismas de manera reversible. Algunas de estas enzimas son la superóxido dismutasa, la catalasa o el glutatión. La actividad de las enzimas antioxidantes se altera con la exposición a EtOH, mientras que, por otro lado, también puede inducir su expresión, como en el caso de la hemooxigenasa 1 o NQO1<sup>75,76</sup>. Por otra parte, la reducción de ROS requiere de otras moléculas que acepten los electrones libres, por lo que la presencia de estrés oxidativo provocará una depleción de los sustratos disponibles, como el propio glutatión o el NAD<sup>+</sup>, disminuyendo la capacidad antioxidante.

Tanto la generación de estrés oxidativo como la consecuente peroxidación lipídica dan lugar a alteraciones en la homeostasis mitocondrial. En primer lugar, la membrana mitocondrial externa sufre daños que propician su desintegración. La estructura en doble membrana de la mitocondria es fundamental para su correcto funcionamiento, por lo que la pérdida de integridad supondrá directamente un fallo en el metabolismo mitocondrial. En segundo lugar, la rotura de la membrana permite la fuga de contenido mitocondrial hacia el citoplasma, lo que desencadenará señales intracelulares. Por ejemplo, la liberación del citocromo c, constituyente de la cadena de transporte electrónico, puede poner en marcha cascadas apoptóticas, activando rutas de muerte celular que desembocarán en eventos de neurodegeneración. Por último, los fallos mitocondriales suponen un desabastecimiento directo del sustrato energético de la célula, el ATP, con lo que infinidad de procesos fisiológicos se verían afectados o interrumpidos. Esto, por tanto, pondría a la célula en peligro de entrar en procesos apoptóticos<sup>77,78</sup>.

La exposición a EtOH directamente puede provocar perjuicios en la membrana de la mitocondria. El consumo crónico altera la morfología de los pliegues de la membrana interna, induce daño en el ADN mitocondrial y disminuye el potencial de membrana. Tanto en adultos como en adolescentes se ha visto que el EtOH abole la expresión de complejos de la cadena respiratoria, disminuyendo así la producción de ATP<sup>77</sup>. La mitocondria, además, posee una serie de mecanismos, denominados comúnmente

## INTRODUCCIÓN

dinámicas mitocondriales, cuyo fin es cambiar la forma y distribución celular del orgánulo, así como regular su número y disponibilidad, como mecanismo adaptativo en respuesta a necesidades celulares o estímulos externos<sup>79</sup>. Los fenómenos más estudiados son los de fusión y fisión mitocondrial, que están regidos por proteínas remodeladoras de membrana. Las proteínas más relevantes en las dinámicas mitocondriales son la proteína 1 relacionada con la dinamina, llamada Drp1 y encargada de la fisión; mitofusina 2 y la proteína del gen de atrofia óptica 1, llamada OPA1, ambas implicadas en fusión<sup>80</sup>. Se sabe que el fallo en los eventos de fusión y fisión se pueden dar tanto por el propio EtOH como por los subproductos derivados de su degradación oxidativa<sup>13,81</sup>. Con todo esto, la exposición a EtOH perturba la integridad de la membrana mitocondrial, cuyas consecuencias incluyen alteraciones en los procesos de dinámica mitocondrial y activación de rutas de señalización de muerte celular<sup>13</sup>.

## BLOQUE II - Memoria

Los circuitos neurales que subyacen a funciones cognitivas esenciales, como el aprendizaje, el control de impulsos, la memoria o la asociación de contextos, se solapan con las áreas cerebrales implicadas en las conductas relacionadas con el uso de drogas y el desarrollo de dependencia<sup>61</sup>. La exposición a drogas de abuso causa un cambio en estas regiones cognitivas para perpetuar el uso de la propia droga mediante procesos de “aprendizaje patológico”, asociando el estímulo de recompensa conseguido con la droga con una conducta de supervivencia<sup>82</sup>. La relación entre el uso de sustancias adictivas y los mecanismos cognitivos que promueven estas conductas se observa claramente en la tercera etapa del proceso de adicción, denominada fase de anticipación y preocupación en el modelo descrito por Koob y Volkow (2010). En esta etapa, pacientes en tratamiento frente a adicciones son altamente susceptibles a la exposición a contextos o pistas ambientales asociadas con el uso de la droga, lo que puede desencadenar respuestas fisiológicas y deseo de consumo, disparando así de nuevo la primera etapa del proceso de adicción (etapa de intoxicación)<sup>83</sup>. Estos comportamientos también se han observado en experimentación conductual preclínica con modelos animales. Aunque todas las drogas son capaces de generar la asociación entre la droga y el estímulo, como método para mantener la búsqueda de la droga, otros tipos de aprendizaje o procesos cognitivos pueden recibir distintos efectos según la droga en cuestión y el tipo o niveles de consumo. En el caso del alcohol, parece claro que sus efectos son bidireccionales: dosis altas interrumpen los procesos cognitivos, mientras que a dosis más bajas se puede potenciar el aprendizaje.

### **1. La función cognitiva de memoria**

La memoria es la función cognitiva que permite procesar, retener y almacenar la información del entorno para formar recuerdos que podrán ser recuperados posteriormente. La formación de la memoria requiere de actividad neural para generar cambios duraderos en la fuerza del flujo de información de la neurona presináptica a la postsináptica. Los estudios de neurociencia cognitiva han dado lugar a una primera categorización general de la memoria en dos tipos principales: la memoria procedimental o implícita (“saber cómo”), que da lugar a habilidades sensorimotoras formadas a través del aprendizaje repetitivo sin acceso mental

## INTRODUCCIÓN

consciente y con recuperación automática de la información; y la memoria declarativa o explícita (“saber qué, dónde y cuándo”), que es la responsable de la rememoración consciente de experiencias, episodios y datos<sup>84</sup>. A su vez, y a grandes rasgos, la memoria declarativa se subdivide en dos clases: la memoria semántica, que recoge el significado de los conceptos verbales y perceptuales; y la memoria episódica, que procesa el aprendizaje y almacenamiento de recuerdos de eventos autobiográficos, enmarcados en un contexto espacio-temporal<sup>85,86</sup>.

Tanto la memoria declarativa como la no declarativa reclutan diversas estructuras cerebrales para conformar su sustrato neural: la memoria procedimental está basada principalmente en sistemas sensorimotores, como el neocórtex sensorial, la corteza motora, el estriado y el cerebelo; mientras que la memoria declarativa establece un circuito que implica el hipocampo, el núcleo talámico anterior, regiones asociativas de la corteza y la corteza prefrontal. La amígdala, encargada del procesamiento y aprendizaje emocional puede estar relacionada con ambos tipos de memoria<sup>86</sup>. Estas estructuras, como ya se ha indicado al comienzo de esta sección, además de su papel en funciones cognitivas, también presentan actividad sináptica inducida por la exposición a drogas o a estímulos ligados a estas. Así, el efecto del consumo de sustancias adictivas sobre la función cognitiva de memoria se podría entender como un mecanismo que garantiza la transición entre la ingesta puntual y el desarrollo del hábito de uso con la consecuente dependencia a la droga<sup>60</sup>.

### 1.1. LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

La memoria de reconocimiento es un tipo de memoria declarativa que rige la distinción entre objetos, conceptos o experiencias nuevas de las previamente vividas o encontradas y es vital para la actualización y el registro de cambios en el entorno externo. Este proceso requiere la participación de múltiples estructuras cerebrales para la compleja dinámica de formación de memoria, pero se han determinado tres regiones cerebrales críticamente implicadas: el hipocampo, la corteza perirrinal y la corteza prefrontal<sup>87,88</sup>. La investigación sobre este tipo de memoria ha tratado de esclarecer si estas áreas están especializadas en aspectos específicos que conforman el manejo de la huella de memoria (temporalidad, asociación espacio-contextual, consolidación, recuperación,...), obteniéndose resultados heterogéneos, pero sí está claro que actúan de manera interdependiente para codificar la información sobre la entidad analizada y discriminarla de otras. De esta manera, los modelos cognitivos actuales proponen que estas tres estructuras cerebrales, funcionalmente distintas, conforman un sistema triple

complementario que se organiza jerárquicamente con otras zonas cerebrales para generar el circuito de la memoria de reconocimiento<sup>88</sup>. Para la presente Tesis Doctoral, nos centraremos en el papel del hipocampo en esta función.

## 2. El hipocampo

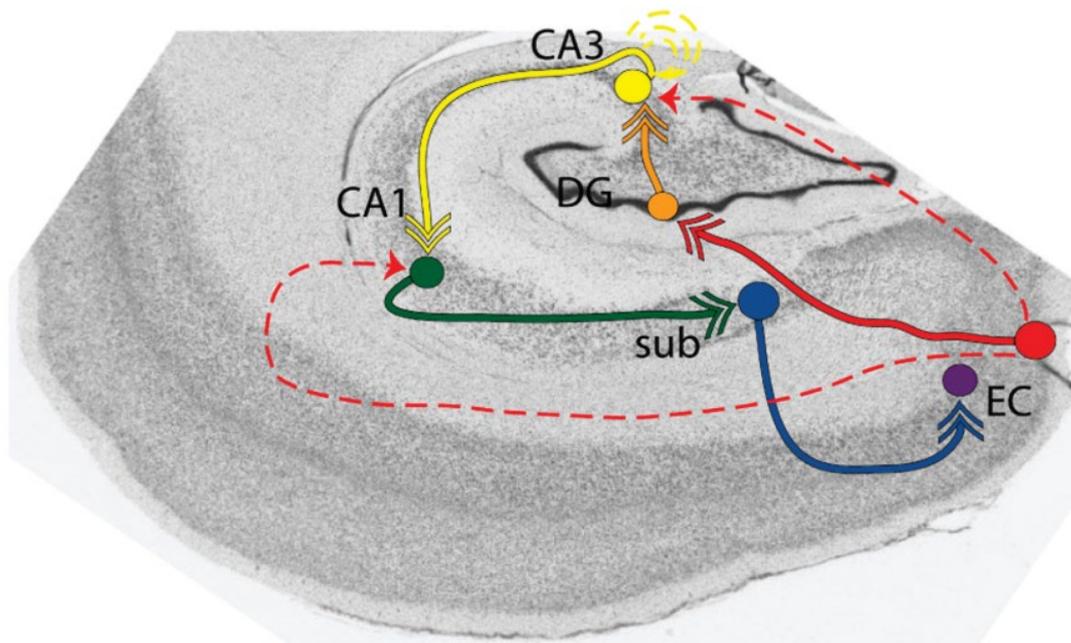
El hipocampo es la estructura cerebral considerada la base central de la función de memoria por excelencia. Mientras que en roedores, el hipocampo se halla justo debajo del neocórtex, en el cerebro humano, el hipocampo es una estructura elongada la cual podemos encontrar en el lóbulo temporal medial. Este sistema anatómico comprende un conjunto de áreas conocidas como la formación hipocampal (o simplemente hipocampo), constituida por el giro dentado, el subículo y las regiones del *Cornu ammonis* 1-3 (CA1-3), además de las áreas adyacentes de la corteza entorrinal, perirrinal y parahipocampal<sup>85,89</sup>.

### 2.1. NEUROANATOMÍA HIPOCAMPAL

En un primer momento, se estableció un modelo de circuitería hipocampal en secciones con un bucle cerrado conectando unidireccionalmente la corteza entorrinal con el giro dentado y con las áreas CA1-3, llamado circuito trisináptico (Fig. 3). La corteza entorrinal establece la principal aferencia en el hipocampo con fuertes proyecciones al giro dentado. El giro, a su vez, proyecta a la región CA3 por la vía de las fibras musgosas, mientras que de esta área surgen aferencias hacia la región CA1 a través de la vía colateral de Schaffer. Además, en CA3 podemos encontrar axones que mandan proyecciones paralelas que conectan con otras neuronas en CA3. Finalmente, la región CA1 proyecta de vuelta hacia la corteza entorrinal a través del subículo, cerrando así el bucle. Cada sección conteniendo este circuito se denominaba lamela y se pensaba que el hipocampo se estructuraba como un conjunto de lamelas, organizadas en módulos funcionales independientes que se sucedían en el eje longitudinal. Las técnicas de neuroimagen modernas han permitido desvelar que se establecen conexiones transversales a toda la longitud del hipocampo, con lo que las lamelas no son funcionalmente independientes y las redes neurales presentes en esta estructura cerebral forman una circuitería compleja

## INTRODUCCIÓN

con múltiples conexiones de retroalimentación paralelas. De esta manera, se conocen conexiones desde la corteza entorrinal directamente a CA1 y CA3. El giro dentado también recibe proyecciones desde CA3 a través del hilo dentado<sup>90,91</sup>. Por último, se sabe que el área CA2, considerada anteriormente como una mera transición entre CA1 y CA3, posee sus propias funciones, por lo que se considera un área computacional independiente de las otras dos. Aunque la información sobre esta área es notablemente más escasa que sobre las otras dos, se piensa que la región CA2 está fuertemente involucrada en el procesamiento de memoria social<sup>92</sup>.



**Figura 3. Circuito trisináptico del hipocampo.** DG: giro dentado; EC: corteza entorrinal; sub: subículo. Imagen tomada de Tammimga et al., 2012<sup>93</sup>.

Desde áreas exteriores al lóbulo temporal medial, la corteza entorrinal recibe aferencias desde la corteza prefrontal y la corteza olfativa, a donde también devuelve conexiones. Al hipocampo llegan inputs directos del septum medial (que juega un papel clave en la regulación del estado fisiológico del hipocampo), locus cerúleo, núcleo del rafe y la amígdala. La región CA1 proyecta al núcleo accumbens, amígdala y a la corteza prefrontal, en uno de los principales circuitos de la vía corticomesolímbica. El área CA3, así como CA1, manda sus proyecciones a través del fórnix hacia el septum lateral y el cuerpo mamilar del hipotálamo. Todas estas proyecciones involucran sistemas de neurotransmisión diversos, incluyendo fibras serotoninérgicas, colinérgicas, dopaminérgicas, noradrenérgicas y GABAérgicas<sup>91</sup>.

Debemos puntualizar que las conexiones hipocampales pueden variar según el organismo del que estemos hablando, dependiendo, en parte, de la disposición espacial que el hipocampo ocupa en el cerebro. El eje longitudinal en roedores se denomina dorsoventral, con la parte dorsal dispuesta hacia la parte rostral y la ventral, a niveles más caudales. El hipocampo dorsal de roedores contiene la mayor parte de células de resolución espacial fina, mientras que el ventral está fuertemente conectado con la corteza prefrontal y la amígdala. Con ello, ambas partes están diferencialmente especializadas en cognición espacial y emocional, respectivamente. En primates, por el contrario, todo el hipocampo se halla en una posición ventral dentro del lóbulo temporal y se organiza en una orientación anteroposterior, de forma que el hipocampo anterior se corresponde con el ventral en roedores y el posterior, con el dorsal. Muchos estudios que apuntan diferencias entre roedores y primates más bien reflejan las diferencias en el procesamiento del hipocampo dorsal/posterior *versus* el ventral/anterior. Aun así, hay grandes similitudes entre las formaciones hipocampales de organismos mamíferos, por lo que suponen un buen modelo para el estudio de las funciones hipocampales<sup>91,94</sup>.

## 2.2. RELACIÓN FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO CON LA MEMORIA

La primera evidencia de la indispensable implicación del hipocampo en la formación de la memoria se obtuvo en 1957 a raíz del conocido como “Caso H.M.”. Tras un accidente en bicicleta que le causó un fuerte golpe en la cabeza, el paciente H.M. desarrolló un trastorno convulsivo crónico, refractario para diversos tratamientos farmacológicos y totalmente incapacitante para su día a día. Por ello, se resolvió someterle a una lobotomía parcial bilateral del lóbulo temporal medial, extrayendo unos 8 cm de tejido que comprendían parte del hipocampo y del giro hipocampal, además de la amígdala. El resultado fue una marcada reducción de la incidencia de las crisis convulsivas, sin cambios en personalidad ni en capacidad intelectual general. Sin embargo, el resultado más sorprendente e inesperado de la operación fue el desarrollo de amnesia anterógrada, una incapacidad inmediata y completa para crear nuevas memorias, sin afectación de la memoria de eventos de su vida más temprana y con amnesia retrógrada parcial de los últimos meses previos a la operación<sup>95</sup>. A partir de la década de los 80, sucesivos estudios con modelos de amnesia humana en primates no humanos y el surgimiento de casos de daño hipocampal por accidente isquémico o episodios de anoxia permitieron establecer

## INTRODUCCIÓN

que una lesión en el hipocampo es suficiente para inducir un déficit de memoria clínicamente significativo y que la severidad de este déficit se veía exacerbada por la pérdida funcional o tisular de áreas corticales adyacentes. Décadas de estudios en neurociencia cognitiva han permitido ahondar en el conocimiento de los circuitos que conectan el hipocampo con otras regiones cerebrales implicadas en distintos tipos de memoria<sup>96</sup>.

A día de hoy, hay un consenso unánime sobre que el hipocampo es fundamental para la representación de eventos específicos dentro de un marco espaciotemporal, de manera que codifica los recuerdos con respecto a su contexto en una estructura ordinal, relacional y coincidente. Además, el procesamiento hipocampal es capaz de separar los elementos asociados a una memoria cuando se da un cambio de contexto, con lo que permite actualizar rápidamente el estado actual del entorno cuando dejamos de estar en una situación familiar, suponiendo fisiológicamente una respuesta adaptativa y un mecanismo para la cognición retrospectiva (recuerdo) y prospectiva (predicción). Esto quiere decir que el hipocampo posee la capacidad de distinguir entre encuentros con el mismo objeto en diferentes contextos. Por extensión, cuando una información es estable en el tiempo y espacio (por ejemplo, la descripción de un objeto), se usa para inferir la representación mental que es relevante en ese momento. Por tanto, el hipocampo registra los inputs que le llegan de las distintas áreas sensoriales cerebrales, cualquiera sea su naturaleza (espacio, tiempo, sonido, olor,...), y los codifica creando un mapa neural contexto-dependiente<sup>97,98</sup>.

Está bastante aceptado que la información sobre el espacio es codificada obligatoriamente por el hipocampo y la investigación alrededor del rol del hipocampo en la integración de este contexto (seguido de la cognición temporal) es abundante a lo largo de los años. Sin embargo, la integración de información no espacial por parte del hipocampo también acumula numerosas evidencias. Hay dos corrientes teóricas para explicar la respuesta hipocampal a estímulos no espaciales: la primera expone que el hipocampo tiene funciones tanto espaciales como no espaciales; la segunda postula que los datos no espaciales funcionan como señales espaciales encubiertas, siendo como una característica del lugar<sup>97</sup>. De estas dos vertientes de pensamiento, la segunda parece cobrar más veracidad, ya que, generalmente, se ha comprobado que el hipocampo es capaz de

procesar una gran variedad de estímulos y crear representaciones de los mismos en contextos espaciales categorizados<sup>97,99</sup>.

### 2.3. EL HIPOCAMPO Y LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO

Son numerosos los estudios que han analizado la respuesta de células hipocampales en experimentos de reconocimiento de objeto. Uno de los conceptos más establecidos sobre el rol específico del hipocampo en la memoria de reconocimiento es que este área codifica la familiaridad de un objeto en relación con algún componente asociado, especialmente espacial o, en menor medida, temporal. Se considera que la exploración de objetos novedosos se dispara por una incongruencia entre la representación actual del objeto y lo que el hipocampo predice que encontrará en ese sitio<sup>99</sup>. De manera complementaria, hay trabajos con modelos conductuales animales que muestran mayor actividad hipocampal cuando el animal observa una disposición espacial nueva de objetos familiares que cuando la disposición de dichos objetos es conocida<sup>100,101</sup>. Por otro lado, se sabe que el hipocampo gobierna el procesamiento de señales de memoria para periodos breves de tiempo, ya que se ha observado que individuos con lesiones hipocampales bilaterales muestran notables déficits en pruebas de memoria de reconocimiento que implican intervalos cortos de retención de memoria (esto es, en cuestión de segundos), particularmente si la tarea involucra la asociación con características físicas, como formas nuevas<sup>102-104</sup>. Además, otros tipos de memoria de reconocimiento también se ven afectadas en caso de daño hipocampal, como son el reconocimiento de palabra, de olor o facial<sup>105</sup>. Con todo esto, el hipocampo cumple una función clara en la determinación de la familiaridad o novedad de un objeto, si bien su función se ve complementada por otras áreas, especialmente la corteza perirrinal. De esta manera, se sabe que otras áreas extrahipocampales pueden respaldar la función de memoria de reconocimiento, pero la prioridad normalmente recae en el circuito hipocampal<sup>99</sup>.

### 2.4. EFECTO DEL ETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD HIPOCAMPAL

Al igual que para otros tipos de memoria, en la literatura podemos encontrar numerosos estudios que atestiguan el efecto perjudicial que el consumo de diversas drogas de abuso ejerce sobre la memoria de reconocimiento, incluido el EtOH<sup>106-109</sup>. Esto no resulta extraño si tenemos en cuenta que el hipocampo es una de las áreas más susceptibles al

daño por EtOH, junto con la corteza prefrontal y el cerebelo<sup>46</sup>. Por ejemplo, la ingesta de grandes cantidades de alcohol, como las que se dan durante el consumo *binge*, puede dar lugar a eventos de amnesia anterógrada, los conocidos en inglés como *blackouts*, en los que el individuo puede participar en actividades con o sin carga emocional de las que luego no tendrá recuerdo, sin afectar a memorias anteriormente formadas o a las posteriores al periodo de ingesta. Esto indica que el EtOH ejerce un mecanismo de acción que imposibilita la formación de nuevas memorias mientras la persona está intoxicada<sup>110</sup>. Estudios posteriores han demostrado que el EtOH suprime robustamente y durante horas la actividad de las células piramidales de la región CA1, que por estudios clínicos se sabe que es esencial para la formación de memoria explícita. Posiblemente, la inhibición del área CA1 por el EtOH está mediada por el incremento del tono GABAérgico, lo que bloquea los eventos de LTP en el hipocampo<sup>46,111,112</sup>. A más largo plazo, el consumo crónico de EtOH puede disparar programas de apoptosis en células piramidales en CA1, incluso durante periodos de abstinencia<sup>113</sup>. En otras áreas, como en el giro dentado, los efectos del EtOH incluyen la disminución de la proliferación celular o neurogénesis<sup>114</sup>. La relación entre la neurotransmisión hipocampal, la neurogénesis y la plasticidad sináptica con respecto a la memoria, así como la influencia que puede tener el EtOH en estos procesos, se explicará más detalladamente en las siguientes secciones.

### **3. Neuroplasticidad: mecanismo de aprendizaje y memoria**

La plasticidad sináptica está considerada como el mecanismo básico del aprendizaje y la memoria, por el cual la fuerza de las conexiones neuronales se modifica en función de sus niveles de actividad. El aprendizaje tiene lugar gracias a cambios persistentes inducidos por la experiencia en las representaciones y computaciones cerebrales que, en consecuencia, guían la correcta realización de tareas. Por tanto, la actividad de las neuronas de salida de una región cerebral responde a cambios adaptativos que se producen según la información de entrada, de manera que estas neuronas puedan mejorar el comportamiento asociado o modularlo en caso de cambios en el entorno, para asegurar una respuesta conductual satisfactoria<sup>58</sup>.

Santiago Ramón y Cajal acuñó por primera vez el término plasticidad neuronal en eventos no patológicos. Más tarde, en 1949, Donald Hebb propuso lo que a lo largo de los

años se ha convertido en uno de los principios más importantes en neurociencia cognitiva. El postulado de Hebb sostenía que si una neurona presináptica A disparaba de manera sostenida y persistente sobre una neurona postsináptica B, la integridad de esa conexión se vería reforzada mediante cambios metabólicos y estructurales que favorecían su estabilización<sup>115</sup>. En la década de los 70, se descubrió de facto que la activación repetida y sincrónica de la neurona presináptica y postsináptica de una conexión estimulada daba lugar a un aumento de la fuerza de la aferencia sináptica. Este fenómeno de plasticidad dependiente de actividad neural pasó a denominarse potenciación a largo plazo, o LTP, y la investigación en años posteriores describió su contrapartida, conocida como depresión a largo plazo, o LTD, que sería la disminución de la fuerza sináptica. Ambos tipos de plasticidad sináptica se consideran hoy día como dos de los grandes procesos dependientes de actividad sináptica que contribuyen de manera esencial al aprendizaje y a la formación de memoria<sup>58</sup>. Se descubrió que el mecanismo principal que mediaba estos cambios sinápticos se debía a las propiedades del receptor glutamatérgico NMDA, si bien posteriormente se demostró que no era el único receptor de glutamato implicado, con el receptor AMPA cumpliendo funciones fundamentales<sup>116,117</sup>. Por otro lado, hay otros mecanismos de plasticidad sináptica hipocampal involucrados en la función de memoria, como son la remodelación de la ECM y la neurogénesis<sup>118</sup>. Estos aspectos de la reorganización hipocampal como eventos clave del aprendizaje y la memoria serán detallados a continuación.

### 3.1. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El aminoácido glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC adulto y posee un rol central en el aprendizaje y la memoria a través de los eventos de LTP y LTD dependientes de actividad. Dada la presencia del glutamato en todas las regiones cerebrales y las múltiples funciones que cumple en el funcionamiento cerebral, es necesario un fino control de sus niveles y su actividad<sup>119,120</sup>; de ahí que el desequilibrio en la homeostasis glutamatérgica, que potencialmente puede dar lugar a un estado de excitotoxicidad, esté relacionado con múltiples patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, neurológicas y adicción<sup>121-123</sup>.

El glutamato media su señalización a través de dos tipos de receptores: los ionotrópicos, que forman canales de cationes regulados por ligando, y los metabotrópicos,

## INTRODUCCIÓN

acoplados a proteínas G reguladoras y sistemas de segundos mensajeros. La activación de unos u otros generará respuestas distintas en las células, que variarán en el tiempo de actuación: los receptores ionotrópicos, normalmente, modulan las corrientes eléctricas excitatorias asociadas a la despolarización de la membrana neuronal, mientras que los receptores metabotrópicos dan lugar a respuestas más lentas a través de cascadas de señalización intracelular<sup>120,124</sup>. Por otro lado, un segundo factor implicado en la señalización glutamatérgica son los transportadores, que se encargan de la retirada del neurotransmisor de la hendidura sináptica. En el caso del glutamato, la astrogliá es vital para su recaptación, evitando fenómenos de excitotoxicidad por estimulación sostenida de los receptores postsinápticos, así como para reciclar el glutamato de la sinapsis y devolverlo a la neurona presináptica para que esté disponible para un nuevo impulso sináptico<sup>125</sup>. Además, en el contexto del uso de drogas, tanto la transmisión como la recaptación del glutamato se alteran, de manera que se origina un estado hiperglutamatérgico que promueve la conducta de búsqueda de la droga y los cambios sinápticos que aseguran la continuación del consumo<sup>121,126</sup>.

### 3.1.1. Receptores ionotrópicos de glutamato: NMDA y AMPA

Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasificaron en familias en función de sus características farmacológicas y los compuestos agonistas por los que se identificaron. De esta manera, las tres familias clásicas de receptores ionotrópicos son, como se mencionó en secciones anteriores, los receptores NMDA, AMPA y kainato. Más recientemente, se ha identificado por homología génica un nuevo subtipo de receptor glutamatérgico ionotrópico, que se ha denominado receptor  $\delta$  o GluD, aunque aún se considera un receptor huérfano ya que no se ha determinado su ligando y está por esclarecer si forma un canal iónico<sup>120</sup>.

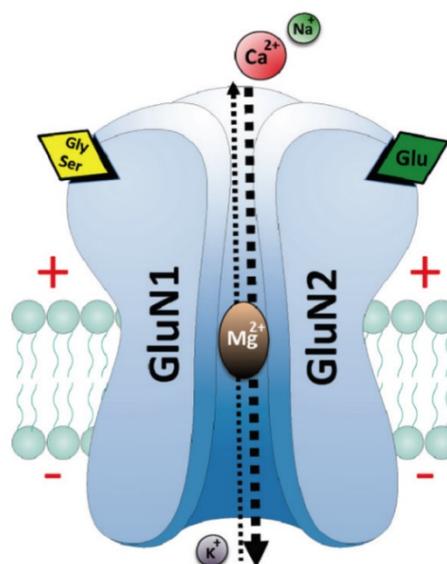
Los receptores ionotrópicos son proteínas integrales de membrana formadas por cuatro subunidades que forman un poro selectivo al paso de cationes tras la unión a glutamato. Así, la activación de estos receptores permitirá el flujo de iones  $\text{Na}^+$  y, en ciertos casos,  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula, mientras que el ion  $\text{K}^+$  saldría hacia el medio extracelular, generando una descompensación de cargas entre ambos lados de la membrana neuronal y facilitando así la iniciación del impulso nervioso. La permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  es una característica importante, dado que este ion, además de las implicaciones

que tiene en la modificación de la diferencia de carga en la membrana plasmática, también funciona como un segundo mensajero, lo que pone en marcha diversas rutas de señalización celular<sup>120</sup>. Las subunidades de los receptores ionotrópicos se ensamblan formando homo- o heterotetrámeros, en el caso de los receptores AMPA y kainato, mientras que el receptor NMDA es un heterotetrámero obligado. En cuanto a la estructura general de los receptores, cada subunidad posee 4 dominios transmembrana, con el dominio extracelular N-terminal, implicado en el ensamblaje y el tráfico del receptor; el dominio de unión de agonista, que es donde se halla el sitio de unión para los distintos ligandos; y el dominio intracelular C-terminal, lugar de modificaciones postraduccionales y que regula la localización del receptor<sup>127</sup>. La importancia biológica de los receptores ionotrópicos de glutamato radica en el hecho de que esta estructura general se ha mantenido a lo largo de la evolución, desde organismos unicelulares hasta seres más complejos, incluyendo plantas, gusanos, insectos o mamíferos<sup>120</sup>. Esta Tesis Doctoral ahondará en las características y funciones de los receptores AMPA y NMDA.

El receptor NMDA fue el primer receptor glutamatérgico caracterizado mediante estudios de radioligando en la década de los años 70. Este receptor es un heterotetrámero formado por el ensamblaje de dos dímeros, de manera que las cuatro subunidades que los forman nunca son del mismo tipo. Hay tres clases de subunidades NMDA: subunidades GluN1 (que sufre *splicing* alternativo, dando lugar a distintas isoformas), GluN2 (de las que existen cuatro subtipos: GluN2A, 2B, 2C y 2D) y GluN3 (con dos subtipos: GluN3A y 3B). Cada dímero cuenta, obligatoriamente, con una subunidad GluN1 que se acompaña de alguna de las subunidades GluN2 o, menos comúnmente, GluN3, confiriendo estas dos últimas las propiedades fisiológicas y farmacológicas al receptor. La combinación más frecuente es la formada por dímeros de una GluN1 con una de las subunidades GluN2, siendo las formas más abundantes el triheterómero GluN1/2A/2B y los diheterómeros de GluN1/2A o GluN1/2B. No obstante, también se han publicado evidencias de la expresión de triheterómeros formados por un dímero GluN1-GluN2 y otro GluN1-GluN3. Los receptores formados por dos dímeros GluN1-GluN3 tienen la particularidad de no presentar sitio de unión para glutamato<sup>119,120,128</sup>. De aquí en adelante, nos limitaremos a receptores GluN1-GluN2, con especial hincapié en las subunidades GluN2A y GluN2B.

## INTRODUCCIÓN

Los receptores NMDA presentan varias diferencias funcionales con respecto a las otras dos familias de ionotrópicos. En primer lugar, el receptor NMDA requiere la unión simultánea de dos ligandos para la apertura del canal. La subunidad GluN2 aloja el sitio de unión para el glutamato (así como para otros agonistas y antagonistas competitivos), mientras que en GluN1 encontramos el del otro coactivador, la glicina. Además, las subunidades GluN2 también presentan el sitio de unión para inhibidores alostéricos, como es el caso del  $Zn^{2+}$ . Otra característica única de los receptores NMDA es que, en condiciones de reposo, el poro del canal se encuentra bloqueado por el ion  $Mg^{2+}$  del medio extracelular y su liberación se produce por la despolarización de la membrana (Fig. 4). Esto hace que la activación del receptor NMDA requiera de la coincidencia de la liberación de glutamato desde la neurona presináptica y la llegada del impulso nervioso a la neurona postsináptica. La fuerza del bloqueo del  $Mg^{2+}$  depende de la constitución de las subunidades, dado que la presencia de subunidades GluN2A y GluN2B permite un bloqueo más potente que cuando hay GluN2C o 2D<sup>46</sup>. La expresión de las distintas subunidades se somete también a regulación espaciotemporal. Por ejemplo, durante el neurodesarrollo embrionario, la subunidad GluN2B es mucho más abundante que la GluN2A. En el periodo postnatal, se produce un cambio de subunidades, de manera que la subunidad 2A se expresa de forma ubicua, mientras que la 2B se restringe a algunas áreas cerebrales y desaparece de otras (como es el caso del cerebelo)<sup>130</sup>.



**Figura 4.** Estructura general de un receptor NMDA diheterodimérico GluN1/GluN2. Imagen tomada de Sanz-Clemente et al. (2013).

Debido a que son las que presentan mayor expresión y por su importante papel en plasticidad sináptica, las subunidades GluN2A y GluN2B han sido objeto de mayor investigación que las demás. Estas dos subunidades tienen distintas propiedades cinéticas y localización celular, con lo que un receptor NMDA presentará unas funcionalidades particulares en función de su combinación de subunidades. La presencia de la subunidad GluN2A confiere una mayor probabilidad de apertura que cuando el receptor contiene la subunidad GluN2B. Sin embargo, la carga que se genera a través de un receptor con

subunidades GluN2B es dos veces mayor que con GluN2A, ya que la desactivación de este receptor es más lenta, lo que permite un mayor tiempo de flujo de iones. Por otro lado, hay estudios que parecen sugerir que los canales con subunidades GluN2B movilizan más  $\text{Ca}^{2+}$  que con GluN2A, mostrando por tanto una mayor permeabilidad a este ion. Además, la afinidad del glutamato es mayor por GluN2B que por GluN2A. En cuanto a la localización celular, diversos trabajos apuntan a que la subunidad GluN2B se puede encontrar con más frecuencia en entornos extrasinápticos, mientras que GluN2A tiende a concentrarse en la densidad postsináptica, lo que puede estar compensando su menor afinidad al glutamato. En concordancia con esto, la subunidad GluN2B presenta una movilidad de superficie mucho mayor que la GluN2A y una mayor ratio de endocitosis en neuronas adultas. Sin embargo, esta distribución no es absoluta y puede variar en función de la región cerebral y la etapa de neurodesarrollo<sup>130,131</sup>.

La LTP y LTD dependiente del receptor NMDA son el prototipo de plasticidad sináptica según lo postuló Hebb. Para que se den eventos de LTP, tanto la neurona presináptica como la postsináptica se tienen que activar de manera coincidente: la primera para que se libere el glutamato que genera el impulso nervioso y la segunda para que su despolarización produzca la liberación del  $\text{Mg}^{2+}$  que se encuentra bloqueando el canal NMDA. Tras la despolarización simultánea y la unión del glutamato, se da un flujo máximo de  $\text{Ca}^{2+}$ , que en el interior de la célula pondrá en marcha cascadas de señalización intracelular que ejercerán el reforzamiento de la sinapsis. La LTD, por su parte, tendría lugar cuando la estimulación presináptica ocurre a frecuencias bajas, de manera que no se genera actividad despolarizante en la postsinapsis. Este tipo de plasticidad es muy específica, lo que quiere decir que la liberación de glutamato y despolarización de la membrana postsináptica solo afecta a la sinapsis en cuestión y no a las que se hallen en la proximidad<sup>132</sup>. En este punto, es importante tener en cuenta que, dado que la activación del receptor NMDA requiere la previa despolarización de la membrana postsináptica en la que se hallan insertados, la LTP y LTD dependientes del receptor NMDA está íntimamente ligada a la participación de los receptores AMPA, lo cual detallaremos a continuación (Fig. 5). Por último, si bien la LTP inducida por el receptor NMDA es la más comúnmente estudiada por su importancia fisiológica, no podemos obviar la existencia de otros mecanismos de LTP independientes del receptor NMDA, muchos de ellos estimulados por la interacción con receptores metabotrópicos de glutamato<sup>133</sup>.

## INTRODUCCIÓN

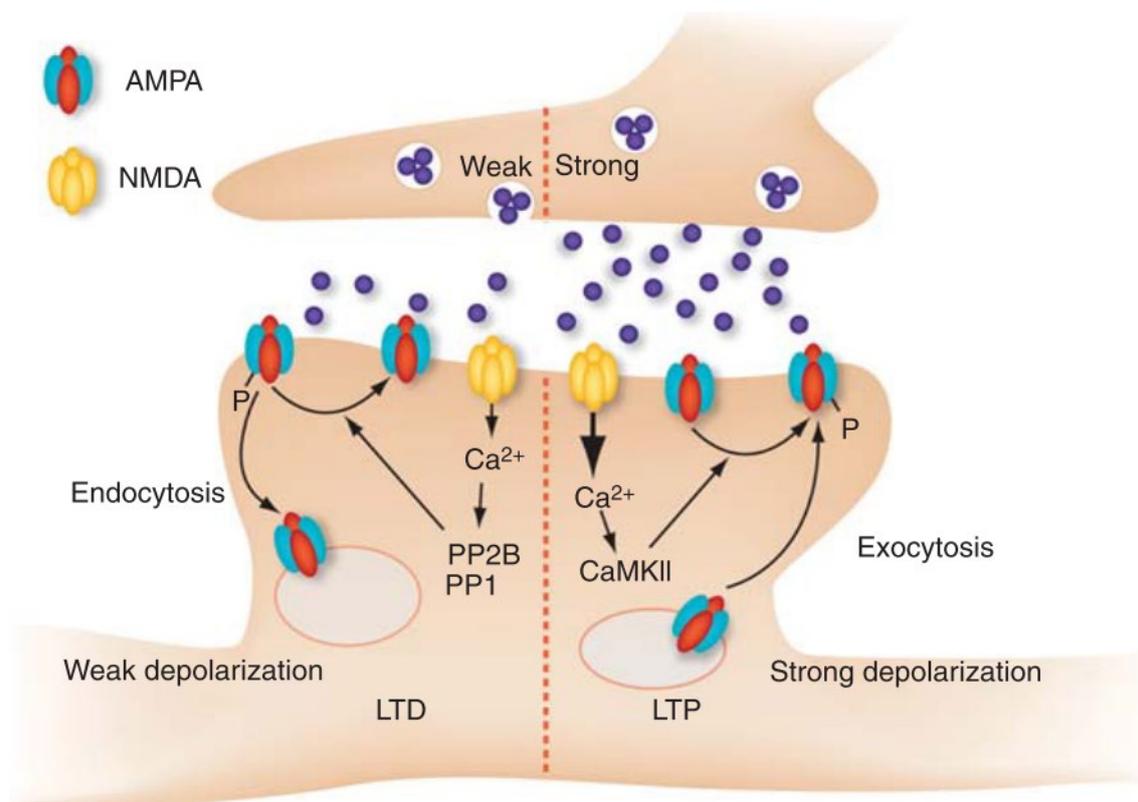
Los receptores AMPA son los encargados de la mayoría de la transmisión glutamatérgica excitatoria rápida en el SNC. La regulación a la que están sujetos, ya sea por modificaciones postraduccionales, variación de subunidades o localización en la membrana, repercutirá directamente sobre la fuerza sináptica, neuroplasticidad y funciones cognitivas. Los receptores AMPA son altamente dinámicos en el sentido de que están constantemente sometidos a endocitosis, exocitosis, difusión lateral por la membrana o atrapamiento en la densidad postsináptica. Así, los receptores AMPA presentes en una sinapsis variarán en número, estructura y propiedades como forma de regulación de los procesos plásticos del cerebro, en favor de la estabilización o la redistribución de las sinapsis<sup>134</sup>.

En cuanto a su estructura, genéticamente, el receptor AMPA posee unos dominios de unión a ligando y transmembrana altamente conservados en la evolución, mientras que los dominios N- y C-terminal son los que sufren las modificaciones postraduccionales y donde difieren las distintas subunidades. Los receptores AMPA se componen de cuatro subunidades, denominadas GluA1-4, que se pueden ensamblar formando tetrámeros, siendo las combinaciones más comunes en el hipocampo GluA1/GluA2, GluA2/GluA3 y, en menor medida, el homotetrámero de GluA1<sup>120</sup>. En el resto del cerebro, y al igual que se ha explicado con las subunidades del receptor NMDA, la expresión de subunidades del receptor AMPA exhibe variedad regional. Además, la subunidad GluA4, por regulación durante el neurodesarrollo postnatal, muestra una expresión notablemente reducida en el cerebro adulto. Además de las subunidades propias del receptor, el receptor AMPA forma complejos con otra serie de proteínas auxiliares, como las TARPs o las CNIH2/CNIH3, que regulan las propiedades del canal y su tráfico sináptico<sup>134</sup>.

Una característica importante de la subunidad GluA2 es que, por sus propiedades eléctricas, no permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que los receptores que contengan esta subunidad serán impermeables a este ion y no aportarán carga al flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en las sinapsis en las que se encuentren. Por otro lado, los receptores que carezcan de GluA2, los cuales en su mayoría son homotetrámeros de GluA1 y en el cerebro adulto se expresan a niveles muy bajos, poseen mayor conductancia, una cinética de desactivación más rápida y son permeables al paso de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los receptores AMPA permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , al contribuir a la carga sináptica por el paso del ion, potencian la transmisión sináptica, lo que puede propiciar la activación de rutas de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>135</sup>. Con esto, hay

evidencias de que la inducción de procesos de plasticidad sináptica, como LTP y LTD, y ciertas conductas, como el condicionamiento al miedo o la exposición o abstención a drogas, promueven el reclutamiento de receptores AMPA permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  a esas sinapsis específicas. Otras formas de regulación de las propiedades del canal se establecen a través de las múltiples modificaciones postraduccionales a las que están sujetos, las cuales, además de generar innumerables variantes del receptor, pueden ser requeridas durante la LTP o LTD<sup>134</sup>.

Como ya se ha mencionado, el receptor AMPA es esencial en la LTP dependiente del receptor NMDA y, aunque las subunidades GluA2 y GluA3 también participan, se sabe que la subunidad GluA1 tiene un papel principal<sup>120</sup>. Una de las principales consecuencias de estos procesos plásticos es el aumento del número de receptores AMPA en la postsinapsis, los cuales migran desde otras zonas de la membrana hasta la densidad postsináptica o son incorporados en la membrana por exocitosis. En especial, la fosforilación en los residuos Ser831 y Ser845 de GluA1 está muy implicada en la LTP. Estas fosforilaciones, impulsadas por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , favorecen el tráfico del receptor AMPA hacia la membrana postsináptica y aumentan tanto la probabilidad de apertura como la conductancia del receptor (Fig. 5). Además, experimentos con mutaciones dirigidas contra esos residuos abolen o dañan los procesos de plasticidad, lo que da cuenta de la importancia de esta subunidad para estos eventos<sup>133,136</sup>. Por otro lado, si bien es GluA2 la subunidad que posee una función más prominente en la regulación de LTD, GluA1 también participa en este proceso. Por ejemplo, cuando se activa la señalización para el establecimiento de LTD en una sinapsis, se reclutan receptores AMPA que solo contienen subunidades GluA1 a través de su fosforilación y la activación de estos canales funciona tanto para la realización de la LTD como para señalar su propia retirada de la membrana<sup>64,137</sup>.



**Figura 5.** Esquema general de la implicación de los receptores NMDA y AMPA en los eventos de LTP y LTD. Ante estímulos eléctricos intensos, la despolarización de la membrana y la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  por canales NMDA dispara la LTP a través de la fosforilación y exocitosis de receptores AMPA, que facilitarían la propagación de un nuevo impulso. Por el contrario, cuando la neurona postsináptica recibe un impulso débil, se produce una despolarización más modesta y un flujo de  $Ca^{2+}$  menor, lo que promueve la endocitosis de los receptores AMPA como mecanismo de LTD. Imagen tomada de Lüscher y Malenka (2012)<sup>132</sup>.

### 3.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato: mGluR2

Los receptores metabotrópicos de glutamato, o mGluR, son receptores acoplados a proteína G que transmiten las señales recibidas desde el entorno externo hacia el interior celular, poniendo en marcha cascadas de señalización de segundos mensajeros que en última instancia controlan y regulan las propiedades de excitabilidad de membrana y transmisión sináptica. Dado que la transmisión por estos receptores implica un buen número de moléculas intermediarias, la respuesta nerviosa mediada por estos receptores es más lenta que la que generan los ionotrópicos. Con siete dominios transmembrana y un dominio N-terminal extracelular de grandes dimensiones que contiene el sitio de unión a ligando, la interacción con el glutamato causa el intercambio de GDP a GTP, lo que activa a la proteína G, que iniciará la cascada de señalización implicando a moléculas señalizadoras, enzimas y factores de transcripción<sup>138</sup>. Al igual que los receptores

ionotrópicos, los ocho receptores mGlu conocidos hasta ahora se han subdividido en tres familias, atendiendo a sus moléculas efectoras asociadas, propiedades farmacológicas y secuencia génica: el grupo I, formado por mGluR1 y mGluR5, localizados en la membrana postsináptica y acoplados a proteína  $G_q$  que señala a través de la fosfolipasa C; el grupo II, formado por mGluR2 y mGluR3, presentes tanto en la pre- como postsinapsis y acoplados a proteína  $G_{i/o}$  que señala a través de la adenilato ciclasa; y el grupo III, formado por mGluR4, 6-8, mayormente presinápticos y también acoplados a proteína  $G_{i/o}$  y adenilato ciclasa<sup>138,139</sup>. Para la presente Tesis Doctoral, nos centraremos en el grupo II, específicamente en mGluR2.

Los receptores del grupo II tienen un destacado papel regulatorio en la regulación de la señalización glutamatérgica. En primer lugar, cumplen una función importante en la estimulación de LTD en sinapsis excitatorias<sup>140</sup>. Más concretamente, cuando en neuronas se localizan presinápticamente, pueden actuar como autorreceptores para disminuir la liberación de neurotransmisores a través de la inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, como los receptores NMDA. Por otro lado, en astrocitos pueden estimular la expresión de transportadores de glutamato, como EAAT2, aumentando la recaptación de glutamato. Ambas acciones pueden contribuir a evitar daño tisular en caso de excitotoxicidad glutamatérgica. Como medidas neuroprotectoras adicionales, también se ha visto que la activación de estos receptores puede inducir la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en modelos de enfermedad de Huntington<sup>141</sup>. No obstante, también pueden potenciar la transmisión a través de receptores NMDA y AMPA, por ejemplo, aumentando su exocitosis y su incorporación a la densidad postsináptica, especialmente mGluR3<sup>123,142</sup>.

Con relación a su funcionalidad fisiológica y cognitiva, se ha descrito que la delección del receptor mGluR2 en ratón provoca un grave daño en la LTD inducida por estimulaciones de baja frecuencia en el hipocampo, dejando la LTP relativamente intacta. La activación de mGluR2 también da lugar a fallos cognitivos, por lo que se ha propuesto como una posible diana terapéutica para enfermedades con daño cognitivo, por ejemplo, mediante antagonismo en enfermedad de Alzheimer<sup>140</sup>. En cuanto a uso de alcohol, se sabe que las drogas de abuso pueden generar déficits en la función de mGluR2 y se ha sugerido que el consumo de EtOH disminuye la expresión de este receptor, lo que causa un mayor consumo de la droga<sup>55</sup>. Respecto a su implicación en formación de memoria,

un trabajo reciente ha propuesto una colaboración entre receptores ionotrópicos y metabotrópicos, de manera que los primeros están implicados en el aprendizaje de algo nuevo, mientras que los segundos se encargarían del refuerzo de ese aprendizaje tras la siguiente exposición al estímulo<sup>143</sup>. Además, los receptores metabotrópicos de varias familias están implicados en los procesos de LTP independiente del receptor NMDA, especialmente los que tienen lugar en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo<sup>133</sup>.

### 3.1.3. Transportadores de glutamato: EAAT2

Los transportadores de glutamato son proteínas integrales de membrana que funcionan como bombas encargadas de la recaptación del glutamato del medio extracelular una vez que se ha producido el impulso sináptico. Hay dos grandes grupos de transportadores: los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT), que retiran el glutamato del espacio extracelular, y los transportadores vesiculares de glutamato, que incorporan el glutamato en las vesículas sinápticas<sup>57,125</sup>.

Los EAAT funcionan como cotransportadores en los que el glutamato entra al interior celular junto con tres iones  $\text{Na}^+$  y un protón y se produce la salida de un ion  $\text{K}^+$ . La unión del glutamato junto con los iones hace que el EAAT sufra un cambio conformacional que lo orienta hacia el interior celular, donde se libera el glutamato y los iones. La unión al  $\text{K}^+$  devuelve al transportador a su orientación extracelular, para poder acoger una nueva molécula de glutamato. Hasta la fecha, se han descrito 5 tipos de EAAT en roedores y humanos, los cuales comparten una homología genética de entre el 50-60 %. En primer lugar, se identificaron en rata las 3 primeras clases de EAAT, que se denominaron GLAST, GLT1 y EAAC1. Sus homólogos en humanos se llamaron, respectivamente, EAAT1, EAAT2 y EAAT3. Las otras dos clases de transportadores se identificaron en humanos y roedores y recibieron el nombre de EAAT4 y EAAT5. La localización de los cinco EAAT varía en las distintas regiones del SNC y podemos encontrarlos tanto en neuronas como en células gliales. De esta forma, los EAAT presentes en células gliales se encargan de la recaptación del glutamato liberado en la hendidura sináptica, así como del ciclo glutamato-glutamina, que es el ciclo de reciclaje por el que se provee a la neurona de glutamina para la síntesis de glutamato. Por su parte, los EAAT neuronales se encuentran en sinapsis más especializadas, como las presentes en el cerebelo, colaborando con la señalización a través de mGluR<sup>144</sup>.

EAAT1 y EAAT2 son los principales transportadores de glutamato en el cerebro, ya que las otras tres familias tienen niveles de expresión mucho más bajos y patrones de localización más restringidos. En el cerebro adulto, EAAT1 se concentra mayormente en cerebelo y algunas estructuras como el hipocampo o la corteza frontal. Por el contrario, EAAT2 presenta poca expresión cerebelar y es más abundante en el cerebro<sup>125</sup>. EAAT2 se localiza casi exclusivamente en astrocitos perisinápticos, siendo responsable del 90 % de la recaptación del glutamato, lo que le confiere un papel crucial en la homeostasis glutamatérgica y en la prevención de excitotoxicidad glutamatérgica<sup>125,144</sup>.

La disfunción de los transportadores de glutamato se ha relacionado con varias enfermedades. En modelos animales se han descrito variantes disfuncionales o expresión alterada de EAAT2 generadas por *splicing* alternativo en patologías como esclerosis lateral amiotrófica, astrocitoma humano, epilepsia o hipoxia, algunas de las cuales también se han detectado en pacientes humanos<sup>144</sup>. Se ha propuesto a EAAT2 como diana para el tratamiento de ciertas adicciones. Por ejemplo, en experimentos de dependencia a morfina, se ha visto que la administración de esta droga, así como la abstinencia, provoca un aumento de la expresión específica de EAAT2 y de la recaptación de glutamato en el hipocampo, mientras que la expresión de este receptor por ingeniería genética en núcleo accumbens puede disminuir las conductas relacionadas con la búsqueda de la droga<sup>145,146</sup>. La ceftriaxona, una cefalosporina de amplio espectro, se ha estudiado por su potencial terapéutico como tratamiento para los trastornos por uso de alcohol. Se ha descrito que el tratamiento con este antibiótico puede disminuir el consumo de EtOH en estudios preclínicos, resultado que iba acompañado de un aumento de la expresión de EAAT2 y de la activación de vías implicadas en supervivencia celular en el circuito corticomesolímbico<sup>57</sup>. Por último, en cuanto a su relación con los procesos cognitivos, se han descrito alteraciones de la expresión de EAAT2 en diversas enfermedades que cursan con déficits cognitivos. Hay trabajos que han relacionado deficiencias en la funcionalidad del EAAT2 astrocítico en el hipocampo con el deterioro cognitivo asociado a la vejez y a la enfermedad de Alzheimer<sup>147</sup>. Otro trabajo reveló que cuando se alteraba el ciclo glutamato-glutamina debido a un fallo hepático se observaban déficits en aprendizaje y memoria espacial<sup>148</sup>. En modelos de psicosis y esquizofrenia se han reportado diversas alteraciones en los niveles de EAAT2, tanto por exceso como por disminución, que pueden ser asociadas al desequilibrio glutamatérgico característico de esta enfermedad<sup>146,149</sup>.

### 3.2. REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: MMP-2 Y MMP-9

Las metaloproteasas, o MMP, son una familia de más de 20 enzimas proteolíticas dependientes de  $Zn^{2+}$  capaces de degradar componentes estructurales de la ECM, comúnmente glicoproteínas, así como de procesar otras moléculas que funcionan como mensajeros o factores de transcripción. Como ya se ha mencionado, la ECM está formada por una red de moléculas con distintas propiedades que otorga un soporte a las células de un órgano y un medio de difusión de moléculas señalizadoras. Por tanto, la degradación de los componentes de la ECM permite la modificación de la distribución celular en un tejido y la actividad de las MMP responde a multitud de estímulos tanto fisiológicos como patológicos, como factores de crecimiento, daño tisular o citoquinas<sup>150,151</sup>. De hecho, se sabe que las MMP participan en procesos de angiogénesis, embriogénesis, neurogénesis y reparación de tejidos, con funciones de proliferación, diferenciación y muerte celular. Con estas propiedades, el desequilibrio en la actividad proteolítica de las MMP es un mecanismo patológico encontrado en enfermedades como insuficiencia cardiovascular, múltiples cánceres, enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Concretamente en el SNC, una sobreexpresión de MMP puede causar, además de daños en la ECM, disrupción de la barrera hematoencefálica, degradación de la mielina y daño neuronal<sup>152</sup>. Diversas drogas de abuso, como cocaína, anfetaminas, nicotina y alcohol pueden inducir una mayor expresión y actividad de MMP-9 en diversas partes del cerebro. Las alteraciones estructurales y moleculares derivadas del aumento de la función de estas enzimas subyacen al establecimiento de las conductas de búsqueda de droga<sup>153,154</sup>.

Atendiendo a los sustratos que degradan y a la organización de sus dominios, las MMP se dividen en varias categorías, de las cuales nos centraremos en la familia de las gelatinasas, a la que pertenecen MMP-2 y MMP-9. Estas gelatinasas, llamadas también gelatinasa A y B, respectivamente, degradan gelatina, colágeno y elastina. MMP-2 se expresa constitutivamente como proforma, la cual, mediante autólisis, da lugar a la forma activa que se libera al espacio extracelular. Por su parte, MMP-9 tiene naturaleza inducible y sus niveles en condiciones fisiológicas se mantienen muy bajos, de manera que su proforma es procesada por enzimas proteolíticas, como MMP-3 o tPA, en situaciones patofisiológicas, de estrés o inflamación. Además, MMP-9, junto con su inhibidor TIMP-1, se almacena en vesículas y, una vez liberada al espacio extracelular, se acumula en zonas cercanas a las sinapsis<sup>151,155</sup>.

Las gelatinasas han sido muy analizadas en relación con los procesos de plasticidad sináptica, tanto por su función para modificar la ECM y la morfología de las espinas dendríticas como por su capacidad para procesar moléculas como factores de crecimiento, neurotrofinas y otras moléculas implicadas en eventos sinápticos<sup>69,72</sup>. Diversos estudios han comprobado que la interferencia con la actividad o expresión de MMP-2 y, especialmente, MMP-9 puede relacionarse con defectos en LTP y LTD, fallos de aprendizaje o cambios en los parámetros electrofisiológicos de las sinapsis, resultados que se han observado tanto en estudios preclínicos como en trabajos con humanos. Más específicamente, MMP-9 puede sufrir una inducción de su actividad tras la realización de pruebas conductuales y tiene un papel esencial para el mantenimiento de la LTP dependiente del receptor NMDA en el hipocampo<sup>70,156,157</sup>.

Se ha descrito que, durante eventos de LTP en hipocampo, el ARN mensajero de MMP-9 se transporta hasta las espinas dendríticas donde, en respuesta a los impulsos sinápticos, se traducirá y activará<sup>158</sup>. Una de las consecuencias de la activación de MMP-9 es la inducción del reclutamiento de receptores NMDA desde compartimentos no sinápticos a localizaciones sinápticas. Se piensa que la actividad degradativa de MMP-9 genera moléculas que a su vez son ligandos de integrinas, las cuales están implicadas en el tráfico de membrana de los receptores NMDA<sup>159</sup>. Otras moléculas, como los  $\beta$ -dístroglicanos, son sustratos de MMP-9 y colocalizan con receptores de glutamato durante periodos de actividad neural. El aumento de la presencia y actividad de los receptores NMDA conducirá a un mayor flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que, tal y como se ha descrito, promoverá la progresión del impulso nervioso<sup>72</sup>. Además, la activación de los receptores NMDA provoca un aumento de los niveles proteicos de MMP-9, con lo que se genera un mecanismo en bucle para seguir impulsando la LTP. Por el contrario, las evidencias apuntan a que MMP-2 no cumple ninguna función en la inducción o mantenimiento de la LTP. Sin embargo, dado que algunos de los sustratos de esta gelatinasa están implicados en plasticidad, como los  $\beta$ -dístroglicanos o la laminina, no se puede excluir su implicación<sup>160</sup>. Adicionalmente, si bien el grueso de la investigación se ha centrado en la plasticidad hipocampal, hay estudios que indican que MMP-9 y, tal vez, MMP-2, pueden tener una función en plasticidad no hipocampal, por ejemplo, en la corteza prefrontal o el cerebelo. No obstante, aún no se ha determinado con solidez el papel de MMP-9 y MMP-2 en la remodelación de la ECM o el reclutamiento de receptores en plasticidad no hipocampal<sup>72,161</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Además de su papel en la formación de la LTP, las MMP cumplen una función en procesos de neurogénesis adulta, ya que la migración de los neuroblastos desde los nichos neurogénicos hasta su destino final requiere de la remodelación de la ECM. Se ha observado un aumento de la expresión de MMP-9 tras la inducción de la diferenciación de progenitores neurales, así como en regiones infartadas en modelos de isquemia, condición en la que las MMP cobran gran importancia para la reparación del área afectada<sup>161-163</sup>. El rol de las MMP en neurogénesis está ligado a su función en angiogénesis, ya que el desarrollo de nuevas células cerebrales depende del aporte<sup>160</sup>. Esta, a su vez, es una de las claves de la implicación de las MMP en procesos tumorales: la degradación de la ECM permite la disgregación de las células cancerígenas de su tejido inicial, favoreciendo la migración de estas células a otros tejidos y, por tanto, promoviendo la metástasis<sup>164</sup>. En el cerebro, está establecido que la expresión de MMP-9 está aumentada en gliomas, glioblastomas y astrogliomas, probablemente liberada al espacio extracelular por la microglía. Además, los niveles de MMP-9 se pueden relacionar con el nivel de malignidad y una peor prognosis del tumor<sup>152,161</sup>.

### 3.3. NEUROGÉNESIS

Durante mucho tiempo se creyó que el cerebro adulto contaba con un número fijo de células nerviosas que no se reponían en caso de daño o pérdida una vez superado el neurodesarrollo. Hoy se sabe que hay zonas del cerebro adulto que contienen progenitores neurales con la capacidad de dividirse y generar células nerviosas en etapas posteriores a la finalización del neurodesarrollo, proceso conocido como neurogénesis adulta. Estas nuevas neuronas se integrarán en circuitos específicos, contribuyendo al funcionamiento de esa área y otorgando la posibilidad de generar nuevas conexiones que respondan a una adaptación al medio. Cabe decir que, si bien el estudio de la neurogénesis adulta en modelos animales, mayormente roedores, es extenso y está respaldado por numerosos estudios, el alcance fisiológico de la neurogénesis en humanos es más complejo y controvertido<sup>118,165</sup>.

Los primeros estudios de neurogénesis adulta se llevaron a cabo en los años 60, pero esos resultados se cuestionaron profundamente. A partir de la década de los 90, el desarrollo de nuevas técnicas de marcaje inmunohistoquímico y microscopía, junto con la identificación de marcadores específicos de linaje celular, posibilitó numerosos avances

en los estudios de neurogénesis<sup>166</sup>. En el cerebro adulto, se han determinado dos nichos neurogénicos, es decir, regiones cerebrales con las condiciones fisiológicas y metabólicas propicias para la proliferación de progenitores neurales: el primero está en la zona subventricular, cuyos progenitores migran hacia el bulbo olfatorio cuando comienzan la división; el segundo lo encontramos en el hipocampo, más específicamente, en la zona subgranular del giro dentado, desde donde los progenitores en proliferación migran hacia la capa de células granulares del giro dentado para integrarse en la circuitería hipocámpal como células granulares maduras, el único tipo neuronal que se genera<sup>167</sup>. Hay un tercer nicho neurogénico, situado en el hipotálamo, del cual se desconoce el destino final de integración de las células que genera<sup>168,169</sup>.

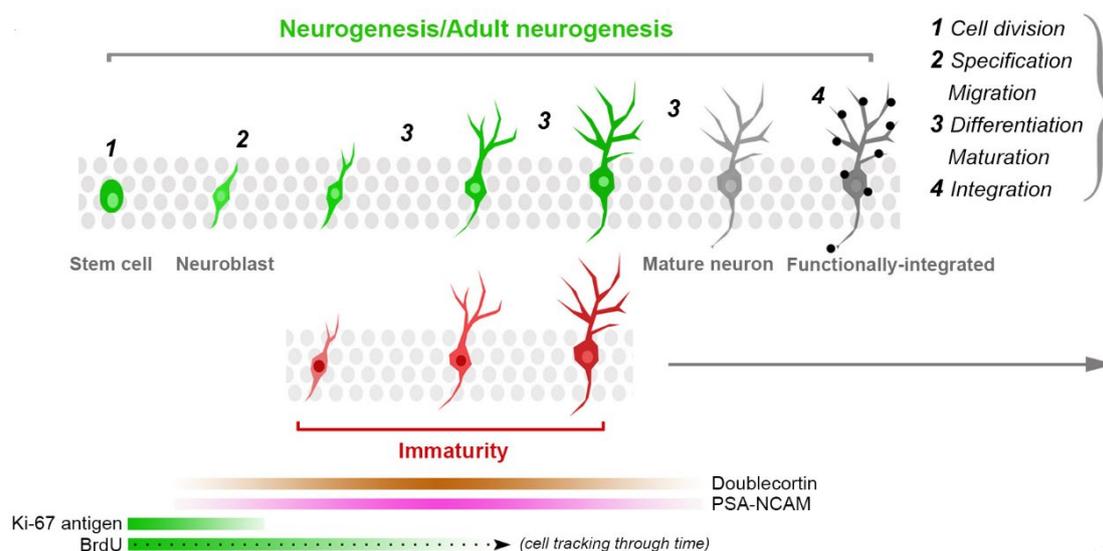
La neurogénesis adulta es un proceso con varias etapas, regulado espacial y temporalmente a través de múltiples factores de señalización y mecanismos epigenéticos y que responde tanto a estímulos extrínsecos (por ejemplo, aprendizaje conductual o ejercicio físico) como a rutas de señalización intrínsecas. El ciclo desde que el progenitor comienza su proliferación hasta que genera una neurona completamente funcional e incorporada en los circuitos preexistentes abarca aproximadamente 4 semanas. En ese lapso, diferentes moléculas señalizadoras irán dirigiendo el destino de la célula, desde la célula multipotente, hasta que se aboca a un linaje neural y comienza a exhibir marcadores de neurona joven, para finalmente generar la neurona madura. No obstante, a partir de esas 4 semanas, aun se tarda entre 2 y 4 meses hasta que una nueva célula sea indistinguible de las que previamente integraban el circuito<sup>169</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no solo la célula de nueva generación completamente madura juega un papel en la función hipocámpal, sino que la neurona inmadura ya comienza a desplegar sus prolongaciones dendríticas y axonales a través de los circuitos hipocámpales y empieza a formar sus espinas dendríticas. Además, las neuronas inmaduras muestran propiedades electrofisiológicas distintas a las de las células maduras, como un umbral más bajo para la LTP, que desaparecen al alcanzar la madurez<sup>170</sup>.

### 3.3.1. Marcadores de estados de maduración de células en división

Las células granulares generadas por neurogénesis adulta progresan a través de una serie de eventos finamente regulados desde que son progenitores hasta su forma final, durante los cuales se irán expresando marcadores que indicarán el estado de

## INTRODUCCIÓN

diferenciación en el que se encuentra. La neurogénesis adulta se ha dividido en varias etapas: proliferación, diferenciación, migración, elongación axonal y dendrítica e integración sináptica (Fig. 6). Durante las dos primeras fases, las células madres neurales, también llamadas glía radial tipo 1, dan lugar a células progenitoras intermedias proliferativas, o células tipo 2, que suponen el puente entre las células multipotentes progenitoras y la célula ya determinada hacia un linaje neuronal. Este tipo 2 dará lugar a los neuroblastos (tipo 3), lo que quiere decir que el destino celular ya ha sido especificado y este progenitor dará lugar a una neurona. Marcadores como Ki67, Sox-2, nestina o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) son típicos de estas fases tempranas de la neurogénesis. A partir de aquí, la célula en diferenciación comienza la fase 3 o de migración, en la cual nos encontramos con neuronas inmaduras que migran una corta distancia desde la zona subgranular hacia la capa de células granulares del giro dentado. La proteína doblecortina (DCX) es probablemente la más usada para marcar neuronas inmaduras. Se trata de una proteína de unión al citoesqueleto, que promueve la polimerización y estabilización de microtúbulos y cuya expresión se limita casi exclusivamente a neuronas en fase de diferenciación, desde los estados de neuroblasto hasta neurona inmadura. Además, también tiene un papel importante en el movimiento de células de nueva generación, por lo que es vital durante la fase de migración. Finalmente, en las fases de elongación e integración las nuevas neuronas mandan sus proyecciones hacia el área CA3 a la vez que van adquiriendo un fenotipo de célula madura. Esto quiere decir que la expresión de DCX se reduce a la misma vez que aumenta la de la proteína NeuN (cuyo nombre oficial es, en inglés, *RNA binding protein fox-1 homolog 3*, *Rbfox3*, o *neuronal nuclei antigen*), marcador de referencia para neuronas maduras, ya que se trata de una proteína soluble presente en el núcleo y citoplasma de una gran mayoría de tipos de neuronas<sup>171,172</sup>.



**Figura 6. Eventos neurogénicos.** La proliferación neuronal atraviesa una serie de fases desde la división del progenitor hasta la formación de una neurona madura que se integrará en el circuito hipocampal. El marcador de estados inmaduros más relevante es DCX y se expresa desde los primeros días de la etapa de neuroblasto hasta que la célula deja de migrar y comienza a integrarse en el hipocampo. Imagen tomada de La Rosa et al., 2020<sup>170</sup>.

### 3.3.2. Moduladores moleculares de neurogénesis

La regulación de la neurogénesis se lleva a cabo involucrando diversos factores, moléculas mensajeras y mecanismos de señalización. Cada paso en la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales cuenta con moduladores específicos, que facilitan una transición dinámica entre las distintas fases. Uno de los principales factores implicados en la regulación de la neurogénesis es el factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF. Se trata del factor neurotrófico más estudiado en cuanto a su papel en proliferación, diferenciación y maduración neuronal y, además, está íntimamente ligado a la inducción de LTP. BDNF pertenece al grupo de las neurotrofinas, junto con el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina 3 y la neurotrofina 4. Estas neurotrofinas ejercen sus acciones señalizadoras a través de la unión con dos tipos de receptores: p75, al que se pueden unir todas, o los receptores de neurotrofina tirosina kinasa (Trk), que son receptores de membrana de los que hay tres tipos con selectividad específica por las neurotrofinas (TrkA para NGF; TrkB para BDNF y neurotrofina 4; TrkC para neurotrofina 3). Para los propósitos de esta Tesis Doctoral, nos centraremos en la señalización a través de BDNF-TrkB<sup>173</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La unión de BDNF al receptor TrkB induce la dimerización ligando-receptor y la autofosforilación en residuos de tirosina (tirosina 515 y 816, o Tyr515 y Tyr816) en el dominio intracelular del receptor. Esto activará las rutas intracelulares de transducción de señales, de las cuales hay tres principales iniciadas por la activación de TrkB, derivando cada una hacia una respuesta enfocada a la facilitación de la supervivencia celular, la proliferación de nuevas neuronas o los mecanismos de plasticidad. La primera de estas rutas es la ruta de las proteínas kinasas activadas por Ras-mitógenos (MAPK), que promueve la diferenciación y crecimiento celular. En segundo lugar, la ruta del fosfatidilinositol 3-kinasa Akt (PI3K-Akt) favorece la supervivencia celular. Akt, también llamada proteína kinasa B y de la que hay tres isoformas, incrementa su expresión en situaciones de estrés o daño celular, de ahí que tenga un rol relevante en señalización de supervivencia. Por último, la ruta de la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) está implicada en plasticidad sináptica. Esta última vía es activada tras la fosforilación en Tyr816, genera una liberación de Ca<sup>2+</sup> de compartimentos intracelulares y activa las kinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, las cuales al traslocar al núcleo activan el factor de transcripción conocido como proteína de unión a los elementos respondedores a AMP cíclico (CREB). La señalización a través de esta cascada modula la transcripción de canales iónicos y otros factores de transcripción que intervienen en la inducción de LTP hipocampal en las áreas CA1 y CA3<sup>172</sup>.

Se sabe que la expresión de BDNF en el hipocampo se induce por estímulos eléctricos del tipo de la LTP, de la misma manera que el tratamiento de células hipocampales con esta neurotrofina induce la iniciación de la LTP. En el sentido contrario, se ha comprobado que, en el hipocampo adulto, la inhibición de la señalización de BDNF mediante su receptor TrkB abole la LTP. Por otro lado, BDNF promueve la proliferación de los progenitores neurales y tanto la administración hipocampal de BDNF como la LTP inducida por BDNF desencadenan eventos de neurogénesis en la zona subgranular. Con todo esto, la literatura científica cuenta con múltiples evidencias de la relación que existe entre las acciones proneurogénicas de BDNF con los eventos de plasticidad sináptica hipocampal<sup>174,175</sup>.

### 3.3.3. Proliferación nerviosa no neuronal

Además de la generación de nuevas neuronas, otros tipos celulares residentes del SNC también pueden ser repuestos en respuesta a estímulos fisiológicos o dañinos. El término astrogénesis hace referencia a la diferenciación de nuevas células astrocíticas. Los astrocitos comparten el mismo origen progenitor que las neuronas, es decir, provienen de las células de la glía radial tipo 1. La generación de nuevos astrocitos es vital para el desarrollo y la regulación de la formación de nuevas conexiones sinápticas. La divergencia del progenitor neural intermedio hacia el fenotipo astrocítico está regulada por la vía de señalización de JAK/STAT, que revierte los mecanismos epigenéticos que reprimen genes astrocíticos, como GFAP, que es el marcador clásico para astrocitos. Otro factor a tener en cuenta es que la neurogénesis es un activador clave de la astrogénesis, ya que se piensa que las neuronas de nueva generación secretan citoquinas que estimulan la diferenciación de astrocitos<sup>176,177</sup>. Por otro lado, también es importante indicar que se pueden dar procesos de reprogramación directa, de manera que, ante ciertos factores, los astrocitos pueden revertir su destino celular y generar neuronas, sin tener que llegar al estado de progenitor multipotente<sup>178</sup>.

Por otro lado, encontramos la gliogénesis o microgliosis, o la generación de nueva microglía. Normalmente este proceso se pone en marcha tras la exposición a un estímulo dañino que genere condiciones proinflamatorias o de estrés celular, de manera que esta nueva microglía se acumula en la zona de la lesión. A diferencia de las neuronas y los astrocitos, y dado que su origen no radica en las células de la glía radial, la microglía activada puede entrar en división proliferativa bajo estímulos patológicos. Diversos modelos animales de patologías como la isquemia o la esclerosis lateral amiotrófica han comprobado que la microglía puede promover una autorrenovación *in situ* y aumentar significativamente su población en la zona perilesional. Además de la división de la propia microglía, hay estudios que sugieren que en el SNC hay un reservorio de progenitores microgliales de origen no periférico (es decir, no infiltran desde otras partes del organismo), aunque su naturaleza no es muy conocida. Por último, parece que la microglía también se puede generar desde un tipo específico de pericitos vasculares que se desdiferencian y adoptan un fenotipo microglial, aunque no se sabe qué alcance puede tener este tipo de microglía en cuanto a las funciones que puede cumplir<sup>179,180</sup>.

### 4. 3,3'-diindolilmetano

El 3,3'-diindolilmetano, o DIM, es un glucosinolato, compuestos principalmente presentes en las plantas de la familia de las brasicáceas o crucíferas (brócoli, coliflor, coles de Bruselas, kale,...). DIM es el principal subproducto de la condensación ácida *in vivo* del indol-3-carbinol (I3C), el cual, a su vez, procede de la hidrólisis de la glucobrasicina. En la literatura, DIM ha sido exhaustivamente estudiado por su notable eficacia como agente antitumoral y hay una enorme cantidad de publicaciones respaldando las propiedades anticancerígenas de DIM en múltiples tipos de cánceres<sup>181,182</sup>. Más aún, DIM se ha llevado a ensayos clínicos para determinar su potencial terapéutico frente a diversos tumores<sup>183-185</sup>. Más recientemente, varios trabajos han sugerido que DIM podría encontrar un uso terapéutico para otras patologías no tumorales, como la colitis ulcerosa o enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson<sup>186,187</sup>.

Los mecanismos de acción de DIM abarcan varias estrategias, influyendo en los procesos de proliferación o en la potenciación de vías de muerte celular y activación de mecanismos antioxidantes, entre otros<sup>188</sup>. La principal diana molecular de DIM es el receptor de aril hidrocarburos (AhR), del cual es un agonista débil. El AhR es un receptor citoplásmico de xenobióticos que cumple funciones en procesos como la proliferación neural, la supervivencia celular y la modulación del sistema inmune. Como sensor de contaminantes, el AhR es diana de una serie de compuestos químicos tóxicos, como los benzopirenos o el TCDD, de los cuales señala su detoxificación. Además, cuenta con ligandos endógenos, principalmente metabolitos del triptófano, como la kinurenina o el ácido kinurénico, la bilirrubina o la lipoxina A<sup>189</sup>. Por otro lado, DIM también interactúa con el receptor de estrógenos, del que es un antagonista. Este es otro de los mecanismos antitumorales de DIM, ya que la inhibición de este receptor puede ejercer efectos antiproliferativos en tejidos que respondan a la señalización de este receptor, como el útero o las mamas<sup>182</sup>. También en cáncer, DIM frena la progresión metastásica gracias a la inhibición de la actividad de las metaloproteasas degradadoras de la ECM, con lo que dificulta la migración de células tumorales a otros tejidos<sup>183</sup>.

Si bien el grueso de la investigación con DIM se ha llevado a cabo con modelos de cáncer, recientemente se han diversificado los campos de estudio hacia otras patologías. En relación con el SNC, las propiedades neuroprotectoras de DIM se han estudiado

mayormente en enfermedades neurodegenerativas, ictus isquémico y drogas de abuso. Nuestro laboratorio ha publicado recientemente un trabajo en el que mostramos que el tratamiento con DIM puede prevenir la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la exposición al compuesto anfetamínico MDMA<sup>190</sup>. En un experimento sobre el metabolismo de la nicotina, el tratamiento con DIM aceleraba el procesamiento de la droga por la inducción de la expresión de citocromos y producía efectos diferenciales dependiendo del animal<sup>191</sup>. Si bien no hay estudios que hayan determinado las acciones de DIM sobre conductas o daños inducidos por el consumo de EtOH, se sabe que, en el hígado, la deficiencia de AhR agrava la enfermedad hepática alcohólica<sup>192</sup>, mientras que la activación de este receptor mejora la enfermedad<sup>193,194</sup>. Por otro lado, el potencial de DIM sobre la mejora o protección de procesos cognitivos no ha sido explotado, encontrando solo un trabajo que aborda este aspecto, el cual demuestra que DIM puede generar efectos neuroprotectores ante daño oxidativo<sup>195</sup>. Por último, un estudio con derivados parafenil sustituidos de DIM muestra que estas moléculas ejercen beneficios para la memoria y la plasticidad sináptica a través de la señalización por vías que implican la participación de BDNF y CREB<sup>196</sup>.



---

# **Hipótesis y objetivos**

---



## HIPÓTESIS

Numerosos estudios han constatado las notables alteraciones cognitivas originadas por la exposición a EtOH en modelos de consumo tipo *binge*, patrón de ingesta más común entre adolescentes y adultos jóvenes. El hipocampo, clave en la función cognitiva de memoria, es una de las áreas cerebrales más afectadas por la toxicidad del EtOH. La neurotransmisión glutamatérgica se encuentra entre las dianas directas sobre las que el EtOH ejerce sus efectos, modificando la funcionalidad y la expresión de los receptores y propiciando un ambiente excitotóxico. Las acciones del EtOH sobre la señalización glutamatérgica impactan directamente sobre la memoria, dado que es el principal sistema de neurotransmisión hipocampal que subyace a esta función. Por otro lado, diversos trabajos han demostrado que la neurogénesis adulta hipocampal disminuye tras el consumo de EtOH, afectando a los fenómenos neuroplásticos estimulados por los eventos de memoria. Asimismo, el EtOH dispara la producción de radicales libres y ROS, de lo cual se deriva un estado de estrés oxidativo. Además de las alteraciones estructurales que estas moléculas provocan en las membranas celulares y de la inducción de cascadas de señalización de muerte celular, se sabe que el estrés oxidativo modula los procesos de proliferación neuronal que tienen lugar en el hipocampo. Con todo esto, la exposición a EtOH induce alteraciones en distintos aspectos de la actividad hipocampal que darán lugar a fallos en la función cognitiva de memoria.

El 3,3'-diindolilmetano, o DIM, es un compuesto presente de forma natural en los vegetales de género *Brassica* que ha sido extensamente estudiado en cáncer por su potencial aplicación terapéutica gracias a sus propiedades antiproliferativas y antimetastásicas. En los últimos años se ha empezado a investigar en otros contextos patológicos y, dentro del SNC, el tratamiento con DIM ha manifestado un carácter neuroprotector, entre otros, por la inhibición de muerte neuronal y por el despliegue de mecanismos antioxidantes. Nuestro laboratorio ha encontrado recientemente evidencias de la neuroprotección por DIM en un modelo de toxicidad por la droga de abuso MDMA.

En base a estas consideraciones, se estableció la siguiente hipótesis: el tratamiento con DIM ejerce mecanismos neuroprotectores que previenen el déficit de memoria desencadenado por la exposición a un modelo *binge* de EtOH.



# OBJETIVOS

Para contrastar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

- I.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la memoria de reconocimiento de objeto tras la exposición a un modelo *binge* de EtOH.
  - a. Estudiar el efecto del tratamiento con DIM en la memoria de reconocimiento a 20 h tras la última exposición a EtOH en ratones macho: efecto del número de dosis de DIM.
  - b. Estudiar el efecto del tratamiento con DIM en la memoria de reconocimiento a 7 días tras la última exposición a EtOH en ratones macho: efecto del momento de administración de DIM.
  - c. Estudiar el efecto del tratamiento con DIM en la memoria de reconocimiento a 20 h tras la última exposición a EtOH en ratones hembra.
- II.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en el sistema glutamatérgico inducidas por el *binge* de EtOH.
  - a. Estudiar la expresión de los receptores de glutamato NMDA, AMPA y mGlu2.
  - b. Estudiar el tráfico a membrana del receptor AMPA.
  - c. Estudiar la expresión del transportador astrocítico de glutamato EAAT2.
- III.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la actividad degradativa de MMP-2 y MMP-9 inducidas por el *binge* de EtOH.
- IV.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la proliferación de nuevas líneas neurales inducidas por el *binge* de EtOH.
  - a. Estudiar la supervivencia de neuronas, microglía y astrocitos de nueva generación.
  - b. Estudiar la supervivencia de neuronas inmaduras.
- V.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la ruta de señalización neurogénica de BDNF inducidas por el *binge* de EtOH.
  - a. Estudiar la expresión de la neurotrofina BDNF.
  - b. Estudiar la expresión de la forma fosforilada del receptor TrkB, la kinasa Akt y el factor de transcripción CREB.
- VI.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la expresión de enzimas de defensas antioxidantes inducidas por el *binge* de EtOH.

**VII.** Determinar los efectos del tratamiento con DIM sobre las alteraciones en la expresión de proteínas implicadas en los eventos de fusión-fisión mitocondrial inducidas por el *binge* de EtOH.

---

# **Materiales y métodos**

---



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Animales de experimentación

Todos los procedimientos con animales se realizaron en ratones macho adultos jóvenes de la cepa C57BL/6J, con un peso promedio comprendido entre 20-25 g y 8 semanas de edad. Adicionalmente, se llevó a cabo un experimento con ratones hembra de la misma edad y peso comprendido entre 15-20 g. Todos los animales eran procedentes de Envigo (Envigo RMS Spain S.L., España).

Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid en condiciones de temperatura ( $21 \pm 2$  °C) y humedad (50-55 %) controladas, sometidos a ciclos invertidos de luz/oscuridad de 12/12 h y con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la Comunidad de Madrid, siguiendo la Regulación Española y Europea (Directiva Europea 2010/63/UE; Real Decreto 1337 de 1 de febrero de 2013; Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo).

## 2. Compuestos administrados

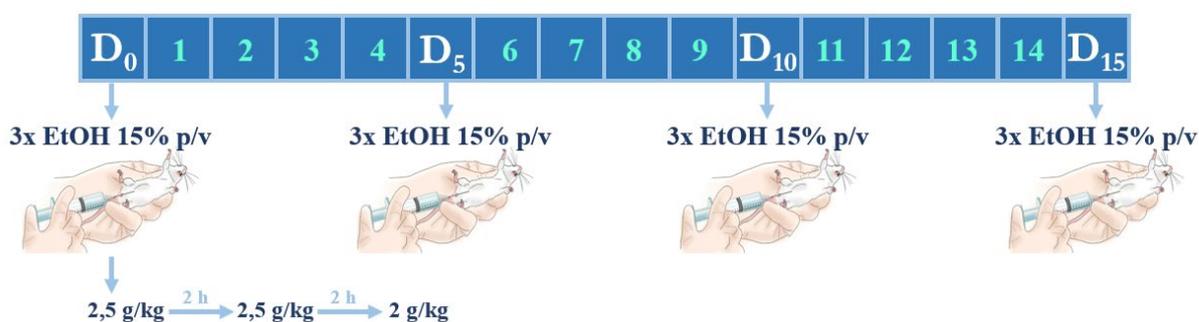
- Etanol absoluto (EtOH; 141086, Panreac AppliChem, España; PubChem CID: 702). El compuesto puro se disolvió en solución salina (0.9 % NaCl) a una concentración del 15 % p/v para administración intraperitoneal (i.p.) a dosis de 2 y 2.5 g/kg, en volumen de inyección de 13.33 y 16.67 mL/kg, respectivamente.
- 3,3'-diindolilmetano (DIM; D9568, Sigma-Aldrich, Merck, España; PubChem CID: 329798906). El compuesto se disolvió en solución acuosa de 0.0125 % 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, 10 % DMSO y 10 % Tween® 80 y se administró por vía i.p. a dosis de 50 mg/kg, en volumen de inyección de 10 mL/kg.
- 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; B5002, Sigma-Aldrich, Merck, España; PubChem CID: 24278270). El compuesto se disolvió en solución salina (0.9 % NaCl) a una concentración de 7.5 mg/mL y se inyectó por vía i.p. a dosis de 75 mg/kg, en volumen de inyección de 10 mL/kg.

### 3. Diseño experimental

#### 3.1. MODELO DE ADMINISTRACIÓN DE ETANOL EN *BINGE* MÚLTIPLE

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado un modelo de *binge* múltiple con el que emulamos sesiones de consumo de alcohol abusivas en un periodo de tiempo de 4 h, en las que la concentración de EtOH en plasma alcanza aproximadamente los 400 mg/dL en animales macho. Se ha descrito que unos niveles plasmáticos de EtOH de 100 mg/dL en ratones se consideran equivalentes a las concentraciones alcanzadas en humanos tras el consumo de EtOH tipo *binge*<sup>197</sup>. Por otro lado, en humanos, el consumo *binge drinking* se categoriza como extremo cuando se alcanzan picos muy elevados de EtOH en sangre, lo que ocurre generalmente cuando la ingesta es 2 o más veces mayor que los umbrales específicos de cada sexo (es decir, 8 o más bebidas para las mujeres, 10 o más para los hombres, en una única sesión)<sup>13</sup>. Teniendo esto en cuenta, nuestro modelo se podría describir como *binge* extremo, dado que, al final de cada sesión, las concentraciones plasmáticas de EtOH alcanzan valores aproximadamente 4 veces mayores a los definidos como *binge drinking* (es decir, alrededor de 400 mg/dL).

El modelo de *binge* múltiple se realizó como se describe en Lacaille et al. (2015)<sup>198</sup>. Los animales de experimentación se sometieron a sesiones de *binge* en las cuales recibieron 3 dosis de EtOH (15 % p/v, 0.9 % NaCl, i.p.) espaciadas cada 2 h entre sí, siendo las dos primeras dosis de 2.5 g/kg y la tercera de 2 g/kg. Los animales control recibieron cantidades isovolumétricas de solución salina (0.9 % NaCl, i.p.). Estas sesiones de *binge* se repitieron cada 5 días, durante un periodo de 15 días, sometiendo a los animales, por tanto, a un total de 4 sesiones de *binge*, designadas en la Figura 7 como día 0 (D<sub>0</sub>), D<sub>5</sub>, D<sub>10</sub> y D<sub>15</sub>, respectivamente.



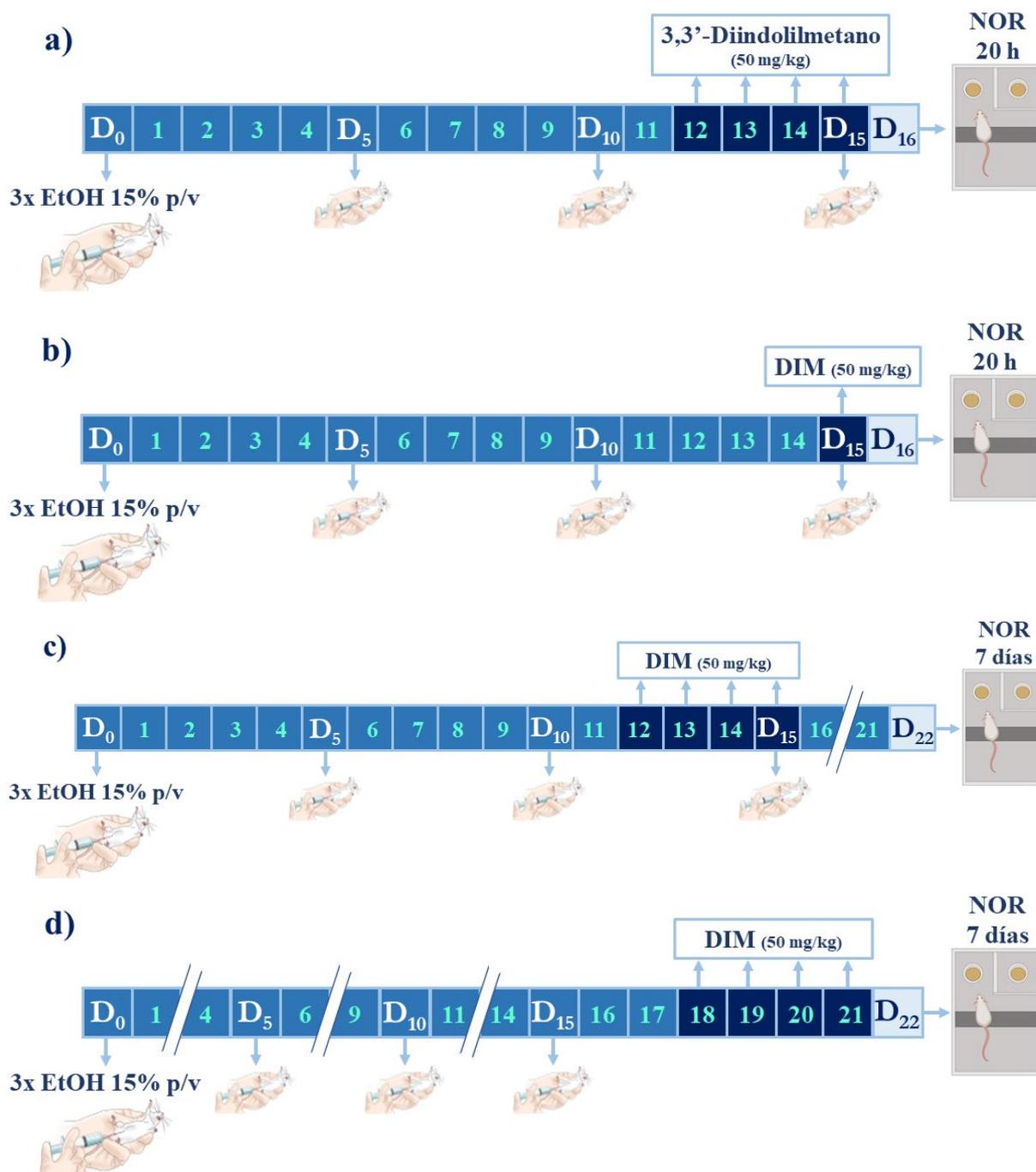
**Figura 7.** Esquema general del protocolo de *binge* múltiple de EtOH. El modelo se compone de 4 sesiones de *binge*, cada una de ellas consistiendo en 3 administraciones intraperitoneales de EtOH, en un periodo de 15 días.

### 3.2. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE DIM: ESTUDIOS CONDUCTUALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE MEMORIA

El primer estudio se diseñó para evaluar si la administración de DIM modificaba los posibles efectos producidos por el consumo de EtOH tipo *binge* sobre la memoria de reconocimiento a diferentes tiempos. Para ello, los animales fueron sometidos a la prueba conductual de reconocimiento de objeto novedoso (NOR, por sus siglas en inglés, *novel object recognition*; ver sección 4.1.) 20 h o 7 días después de la última administración de EtOH según el protocolo de *binge* múltiple. El compuesto DIM se administró a una dosis de 50 mg/kg. Como se puede observar en la Figura 8, se plantearon 4 experimentos para evaluar el efecto del tratamiento con DIM:

- a) 4 dosis de DIM + NOR 20 h: se administraron 4 dosis de DIM los cuatro últimos días del protocolo *binge*, 30 min antes de la primera inyección de EtOH en el D<sub>15</sub>. A las 20 h tras la última exposición de EtOH se realizó el test NOR (D<sub>16</sub>) (Fig. 8a). Este experimento se realizó tanto con ratones macho como con ratones hembra.
- b) 1 dosis de DIM + NOR 20 h: para determinar la influencia del número de dosis en la memoria de reconocimiento. Se administró una dosis única de DIM el D<sub>15</sub>, 30 min antes de la primera inyección de EtOH. A las 20 h tras la última exposición de EtOH se realizó el test de NOR (D<sub>16</sub>) (Fig. 8b).
- c) 4 dosis de DIM + NOR 7 días: se administraron 4 dosis de DIM los cuatro últimos días del protocolo *binge*, 30 min antes de la primera inyección de EtOH en el D<sub>15</sub>. A los 7 días tras la última exposición de EtOH (D<sub>22</sub>) se realizó el test NOR (Fig. 8c).
- d) 4 dosis de DIM preNOR 7 días: con el fin de evaluar si la eficacia del tratamiento con DIM dependía del momento en el que se administrara con relación al momento de administración del EtOH, se inyectaron 4 dosis de DIM (50 mg/kg) los cuatro días previos a la realización del NOR (D<sub>18</sub>-D<sub>21</sub>), ya fuera del protocolo de 4 sesiones de *binge*. A los 7 días tras la última exposición a EtOH y 24 h después de la última dosis de DIM (D<sub>22</sub>), se realizó el test NOR (Fig. 8d).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 8.** Estudio del efecto del consumo tipo *binge* de etanol y el tratamiento con DIM sobre la función de memoria de reconocimiento. (a) NOR realizado a las 20 h tras la última exposición de EtOH con 4 dosis previas de DIM. (b) NOR realizado a las 20 h con 1 dosis previa de DIM. (c) NOR realizado a los 7 días con 4 dosis previas de DIM, recibidas durante el periodo de protocolo *binge*. (d) NOR realizado a los 7 días con 4 dosis previas de DIM, recibidas los 4 días previos a la realización del NOR.

Tras evaluar los cambios en conducta inducidos por los diferentes protocolos de administración de DIM, se decidió realizar todos los estudios bioquímicos en animales sometidos al protocolo de *binge* múltiple con 4 dosis de DIM, representado en la Figura

8a (sin el test de conducta). De esta manera, todos los experimentos se llevaron a cabo con cuatro grupos experimentales:

- Salino + Vehículo DIM.
- EtOH + Vehículo DIM.
- Salino + DIM.
- EtOH + DIM.

Excepcionalmente, en los experimentos para la determinación de niveles plasmáticos de EtOH se omitieron los grupos Salino + Vehículo y Salino + DIM (ver Materiales y métodos, sección 3.3.1.; Resultados, secciones 1.1.1. y 1.1.2.); por otro lado, en el experimento destinado al estudio del tráfico a membrana de receptores de glutamato, se omitió el grupo Salino + DIM (ver Materiales y métodos, sección 3.3.3.1.; Resultados, sección 2.2.1.)

### 3.3. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el hipocampo, dado que es un área cerebral especialmente relevante en procesos de aprendizaje y memoria, y en plasma sanguíneo, en los estudios de metabolización del EtOH.

#### 3.3.1. Metabolización del etanol

##### *3.3.1.1. Efecto de DIM sobre la velocidad de metabolización del etanol*

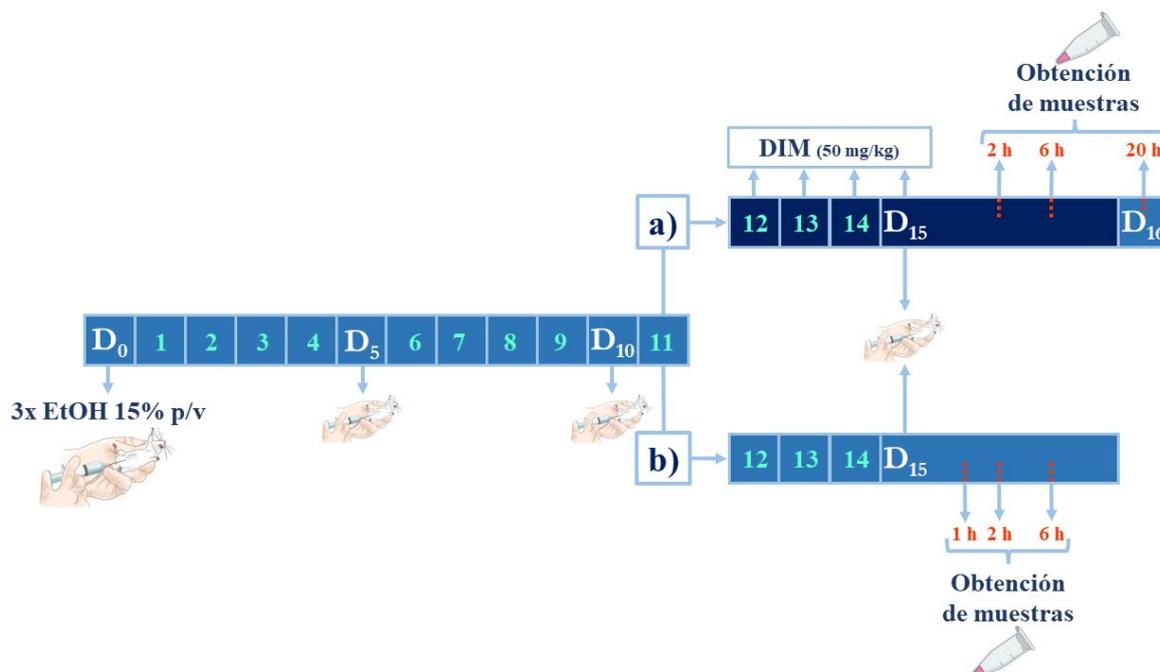
A raíz de las diferencias obtenidas en los experimentos de conducta entre los ratones expuestos a EtOH que fueron o no tratados con DIM, se planteó investigar si DIM ejercía alguna acción sobre el metabolismo del alcohol. Tras la ejecución del protocolo de *binge* múltiple, solo con los grupos EtOH y EtOH + DIM, se realizó un curso temporal en el que se extrajo sangre de la cola a 2, 6 y 20 h tras la última administración de EtOH. El plasma sanguíneo se usó para determinar los niveles de EtOH plasmáticos (Fig. 9a).

##### *3.3.1.2. Metabolización del etanol en plasma sanguíneo en ratones macho y hembra*

Al observar diferencias en los patrones conductuales entre sexos tras el tratamiento con EtOH, se decidió analizar las posibles diferencias en la velocidad de metabolización del EtOH entre machos y hembras. De nuevo, sometimos a ratones macho y hembra al

## MATERIALES Y MÉTODOS

protocolo de *binge* y procedimos a la extracción de sangre de la cola en un curso temporal a 1, 2 y 6 h tras la última administración de EtOH para su posterior análisis (Fig. 9b).



**Figura 9.** Estudios sobre la metabolización del EtOH en plasma sanguíneo. (a) Curva temporal a 2, 6 y 20 h para evaluar el efecto de DIM sobre el metabolismo del EtOH. (b) Curva temporal a 1, 2 y 6 h para comparar la velocidad de metabolización del EtOH entre ratones macho y hembra.

### 3.3.2. Curso temporal del efecto de DIM sobre las alteraciones producidas por el modelo de *binge* múltiple en la actividad degradativa de metaloproteasas

A continuación, se procedió a estudiar el efecto de la exposición al *binge* de EtOH y el tratamiento con DIM sobre la actividad de dos metaloproteasas de matriz: las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Tras el protocolo de *binge* múltiple y el tratamiento con DIM, los animales fueron sacrificados 1, 3 y 20 h tras la última exposición a EtOH con la finalidad de obtener una curva temporal de muestras de hipocampo, donde se ensayaría la actividad de estas gelatinasas mediante degradación de sustrato por zimografía en gel.

### 3.3.3. Curso temporal del efecto de DIM sobre las alteraciones inducidas por el modelo de *binge* múltiple en los niveles de expresión de proteínas de distintos procesos fisiológicos

Al igual que para los estudios de zimografía, se obtuvieron muestras de hipocampo de ratones sometidos al *binge* de EtOH y al tratamiento con DIM a distintos tiempos tras la

finalización del protocolo, para estudiar cambios en la expresión de proteínas implicadas en diferentes eventos celulares mediante *western blot*. A continuación, se detallan las familias y proteínas ensayadas y los tiempos de estudio:

- Señalización glutamatérgica: receptores NMDA, AMPA, mGlu2 y transportador EAAT2 (analizadas a 1, 3 y 20 h).
- Gelatinasa MMP-9 (analizada a 1, 3 y 20 h).
- Ruta de señalización de neurogénesis de BDNF: BDNF y formas fosforiladas de pTrkB Tyr816, pAkt Ser473 y pCREB Ser133 (analizadas a 1, 3 y 20 h).
- Procesos de fusión-fisión mitocondrial: OPA-1, mitofusina 2, DRP-1 y su forma fosforilada pDRP-1 Ser616 (analizadas a 20 h).
- Defensas antioxidantes: catalasa, hemooxigenasa-1, NOX-2, NQO-1, superóxido dismutasa 1 y 2 (analizadas a 20 h).

#### *3.3.3.1. Curso temporal del efecto de DIM sobre las alteraciones producidas por el modelo de binge múltiple en el tráfico a membrana de receptores de glutamato*

Además de estudiar cambios en la expresión de los receptores de glutamato en el hipocampo, se realizó un experimento para determinar cambios que se pudieran estar produciendo en los procesos de integración en membrana o reciclaje de los receptores de glutamato, con el fin de establecer los posibles efectos del *binge* de EtOH y el tratamiento con DIM sobre receptores funcionales. Por exigencias temporales del protocolo, para este experimento se omitió el grupo Salino + DIM.

Los ratones se sometieron al protocolo *binge* y al tratamiento con 4 dosis de DIM, tras lo cual se sacrificaron a 1, 3 y 20 h tras la última exposición. Los hipocampos de los ratones fueron procesados inmediatamente tras su obtención y sometidos a biotilación de superficie. Esta técnica consiste en marcar con biotina exclusivamente los dominios de proteínas que se encuentren expuestos en la cara extracelular de la membrana plasmática, dado que la biotina establece uniones con otras proteínas pero no atraviesa la membrana celular. Posteriormente, el tejido se disgrega y, mediante ciclos de centrifugación, las proteínas unidas a biotina se precipitan usando perlas de estreptavidina, una proteína que se une con altísima afinidad de manera no covalente a la biotina. Así, se obtiene un extracto enriquecido en proteínas localizadas en la membrana plasmática que poseen dominios extracelulares.

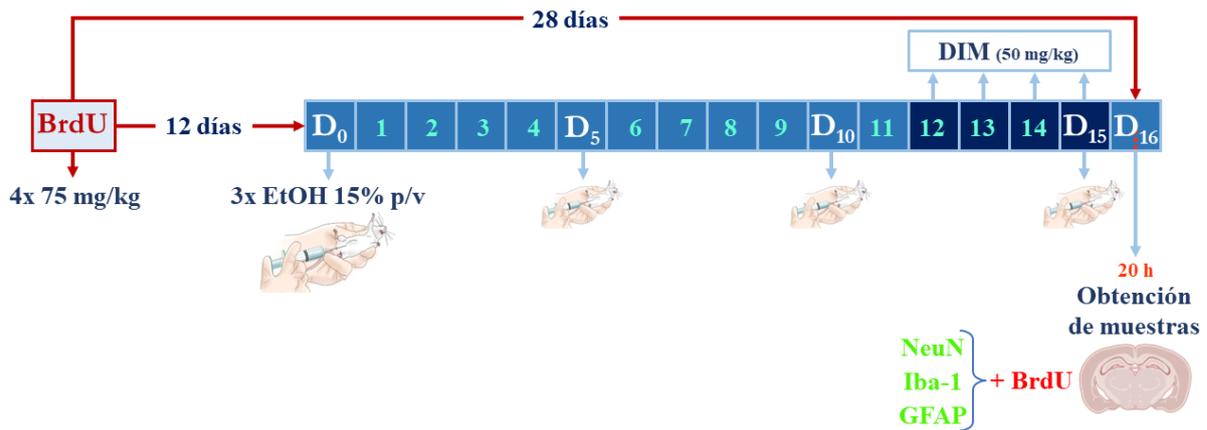
### 3.3.4. Estudios sobre neurogénesis y supervivencia neural

#### 3.3.4.1. Efecto de DIM sobre la supervivencia de células de nueva generación

El siguiente experimento tenía como objetivo estudiar el impacto del *binge* de EtOH sobre la supervivencia de distintos tipos celulares neurales que estuvieran en proceso de diferenciación, así como el posible papel neuroprotector de DIM.

La bromodeoxiuridina (BrdU) es un nucleótido sintético que, por su analogía estructural con el nucleótido timidina, es capaz de incorporarse en el ADN de células que se encuentren en la fase de división del ciclo celular. Por esta propiedad, la BrdU se ha usado como herramienta para estudiar procesos de proliferación y diferenciación celular. En nuestro caso, analizamos la neurogénesis con el marcador de neurona madura NeuN; la gliogénesis con el marcador Iba-1 (del inglés, *ionized calcium-binding adapter molecule 1*); y la astrogénesis con el marcador de astrocito maduro GFAP. Para ello, realizamos estudios de colocalización por técnicas de inmunohistoquímica en los que las secciones coronales del hipocampo fueron incubadas con anticuerpos dirigidos frente a BrdU y el marcador del linaje celular correspondiente.

El proceso de división, diferenciación y maduración por el que un progenitor neural termina convirtiéndose en una neurona madura funcional se desarrolla a lo largo de aproximadamente 4 semanas. Veintiocho días antes del sacrificio, los ratones recibieron 4 dosis de 75 mg/kg de BrdU, con lo que marcaríamos las células que en ese momento comenzaban a dividirse. Después de 12 días, los animales fueron sometidos al protocolo de *binge* múltiple y al tratamiento con DIM, por lo que esas células marcadas con BrdU fueron expuestas a los efectos del EtOH y de DIM cuando se encontraban en proceso de diferenciación y maduración celular. Tras la finalización del protocolo de *binge*, se sacrificó a los animales a las 20 h tras la última exposición a EtOH, con lo que analizaríamos si esos progenitores neurales que comenzaron a generar nuevas células habrían sobrevivido al efecto del EtOH y habían conseguido llegar a formar una célula madura (Fig. 10).

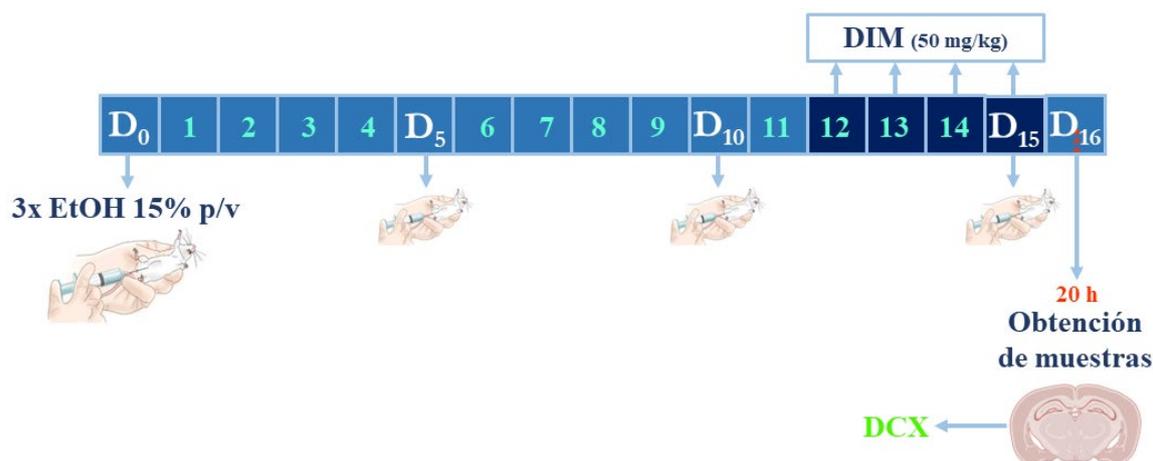


**Figura 10.** Estudio del efecto del modelo de *binge* múltiple y el tratamiento con DIM sobre la supervivencia de células de nueva generación. BrdU se administró 28 días antes de la extracción de tejidos para permitir la conclusión de un ciclo completo de diferenciación y maduración celular. Al finalizar el modelo, los animales fueron sacrificados y los cerebros extraídos por fijación en paraformaldehído.

#### 3.3.4.2. Efecto de DIM sobre la supervivencia de neuronas inmaduras

El concepto de este experimento es similar al anterior, pero el objeto de estudio serían neuronas inmaduras, es decir, que comenzaron a dividirse una vez implementado el modelo *binge*. Con ello, lo que buscamos estudiar es qué le ocurre a la respuesta de neurogénesis hipocampal que se activa una vez expuesto el cerebro al impacto del consumo de EtOH.

La doblecortina, o DCX, es una proteína de asociación a microtúbulos que se expresa en neuronas en desarrollo en las primeras etapas de su ciclo de maduración. Esto quiere decir que el progenitor neural expresa DCX hasta aproximadamente el día 14 tras el comienzo del ciclo de diferenciación. A medida que avanza el proceso, la cantidad de DCX disminuye a partir del día 14, coincidiendo con el aumento de NeuN, que comienza a aparecer cuando ya la neurona es funcional. Según el desarrollo de nuestro modelo de administración de EtOH, al analizar DCX como marcador estaríamos seleccionando neuronas inmaduras que comenzaron su proliferación una vez comenzado el protocolo de *binge*. En este experimento, los animales fueron sometidos al *binge* múltiple y al tratamiento con DIM y se sacrificaron a las 20 h tras la última administración de EtOH (Fig. 11).



**Figura 11.** Estudio del efecto del modelo de *binge* múltiple y el tratamiento con DIM sobre la supervivencia de neuronas inmaduras. Los animales fueron sometidos al *binge* múltiple y tratados con 4 dosis de DIM. Al finalizar el modelo, los ratones fueron sacrificados y los cerebros se sometieron a fijación en paraformaldehído. Con este planteamiento se estudió la supervivencia de neuronas jóvenes.

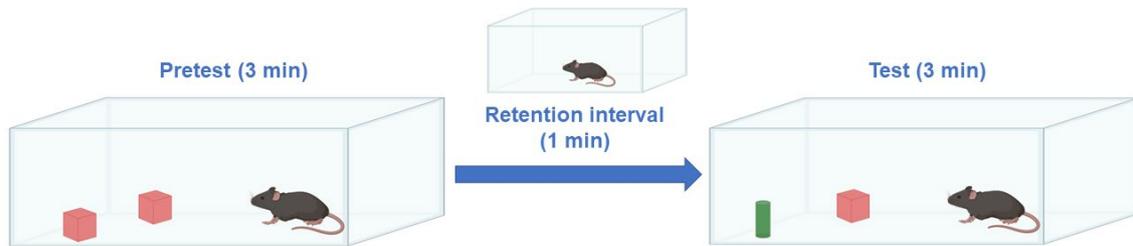
## 4. Obtención, procesamiento de muestras y técnicas experimentales

### 4.1. CONDUCTA: TEST DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO

El test de reconocimiento de objeto novedoso, o NOR, se realizó siguiendo la metodología descrita previamente<sup>199</sup>. Como arena para realizar la prueba de conducta utilizamos cajas cuadradas abiertas (24 x 24 x 15 cm) y los objetos de exploración fueron dos piedras pequeñas de río y un juguete de plástico no tóxico. En cada ronda, se colocaron conjuntamente cuatro cajas en el suelo de la habitación de conducta, la cual estaba iluminada por una fuente de luz roja. Una cámara Sony DCR-DVD310E (Sony, Japón) permitió la grabación simultánea de cuatro ratones en cada ronda.

Esta prueba se realizó en dos días: primero, la fase de habituación y, al día siguiente, la fase de registro. En la fase de habituación, el ratón se puso en el centro de la caja vacía para explorar libremente el ambiente durante 2 min. Se limpió la caja con EtOH al 70 % antes de introducir el siguiente animal. En la fase de registro, el animal se introdujo en la arena de test con las dos piedras colocadas en uno de los lados de la caja, separadas entre sí y a 5 cm de la pared, y se le permitió explorar libremente las piedras durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se sacó al ratón de la caja durante 1 min, periodo conocido como intervalo de retención, y se le alojó en una jaula provisional. Durante este minuto,

una de las piedras se sustituyó por el juguete. Al finalizar el intervalo de retención, se devolvió al ratón a la arena de prueba durante otros 3 min para la fase de test, en la que el animal volvería a explorar los objetos presentes en la caja (Fig. 12). En cada ronda de grabación se rotó el lado de la caja donde se colocaban las piedras (arriba, izquierda, abajo, derecha), así como la piedra sustituida (derecha o izquierda), con el fin de aleatorizar los posibles efectos ambientales que pudiera interferir con el test, como la orientación de los objetos o la iluminación de la sala.



**Figura 12.** Esquema representativo del paradigma utilizado durante la prueba NOR. Imagen creada en Biorender.com.

El índice de discriminación (ID) es el factor que se utilizó como indicativo del estado de la función de memoria de reconocimiento. Se trata de una relación que se obtiene a partir de la diferencia de tiempo que pasa el ratón explorando el objeto nuevo ( $t_N$ ) frente al familiar ( $t_F$ ) y el tiempo de exploración total, expresado como porcentaje:

$$ID (\%) = \frac{t_N - t_F}{t_N + t_F} \times 100$$

El resultado del análisis de los vídeos con la prueba de conducta NOR (ver Resultados, sección 1) se expresa como la media de medias de varios investigadores, los cuales desconocían la asignación de los tratamientos.

## 4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

### 4.2.1. Plasma sanguíneo

Se obtuvo sangre de la cola para la determinación de la concentración de EtOH en plasma. La extracción se realizó mediante una incisión de 1 mm, extrayendo 25  $\mu$ L de sangre usando una pipeta con 5  $\mu$ L de EDTA, para evitar la formación de coágulos. La sangre se recogió en tubos de 1.5 mL con EDTA al 10 %, se centrifugó a 1300 x g (Sorvall ST 8R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, España) a 4 °C durante 10 min y se recogió el plasma, que se congeló a -80 °C, hasta su posterior procesamiento y utilización.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.2. Tejido cerebral

El cerebro se diseccionó sobre hielo para extraer los hipocampos y, para los experimentos de *western blot* y zimografía, estos se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. En el caso del experimento de biotinylation de superficie, los hipocampos se procesaron en fresco, inmediatamente después de su extracción, y al finalizar la homogenización, cuantificación de concentración proteica y precipitación de muestras, se congelaron a -20 °C hasta su uso en los ensayos correspondientes. En el caso de los experimentos de inmunohistoquímica, el cerebro se extrajo completo tras la perfusión y se congeló a -20 °C hasta su estudio

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN SANGRE

La concentración de EtOH en plasma se determinó en un analizador de EtOH (AM1 Alcohol Analyser, Analox, Reino Unido). El ensayo está basado en la oxidación del EtOH por la enzima alcohol deshidrogenasa en presencia de oxígeno molecular. Bajo condiciones apropiadas, la velocidad máxima de consumo de oxígeno es directamente proporcional a la concentración de EtOH. Los niveles de EtOH en plasma se expresaron en mg/dL, usando como estándar de EtOH una solución de concentración 100 mg/dL.

### 4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA EN HOMOGENADOS TOTALES

La determinación de la concentración de proteínas en las muestras usadas tanto para zimografía como para *western blot* se realizó mediante una modificación del método de Lowry, siguiendo el ensayo colorimétrico comercial DC Assay Protein (Bio-Rad, EE.UU.). La reacción se basa en la reducción del reactivo de Folin tras la unión, en medio alcalino, de iones  $\text{Cu}^{2+}$  a residuos aromáticos de las proteínas, que genera un color azul en la muestra<sup>200</sup>.

Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra homogenizada, a la cual se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla en proporción 50:1 de solución alcalina de tartrato de cobre y solución surfactante. A continuación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin diluido y la reacción se dejó incubar durante 5 min, en los que la muestra adquirió un color azul, debido al reactivo de Folin reducido, de intensidad proporcional a la cantidad de proteína presente. Tras los 5 min, se determinó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 750 nm

(ELX8080 IU, Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., EE.UU.) y se interpoló este valor en una recta estándar realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), ensayadas en el mismo momento y en las mismas condiciones que las muestras. Cada muestra experimental y de la curva estándar fue analizada por triplicado.

#### 4.5. ZIMOGRAFÍA Y WESTERN BLOT

##### 4.5.1. Procesamiento de hipocampos para la determinación de la actividad enzimática de metaloproteasas por zimografía y de la expresión de proteínas por *western blot*

El hipocampo se homogenizó en proporción 1:10 (p/v) en tampón de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NP-40 1 %, pH 7.4), en el caso de los ensayos de zimografía y en la determinación de proteínas de señalización glutamatérgica y MMP-9, o en tampón RIPA (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1 %, deoxicolato sódico 0.5 %, SDS 0.1 %, pH 7.4), en el caso de las proteínas mitocondriales, de defensas antioxidantes y de señalización de la ruta de BDNF. En ambos casos se suplementaron con inhibidores de proteasas al 5 % y de fosfatasa al 1 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y manteniendo el tejido en hielo durante todo el proceso. La disgregación del tejido se realizó con el equipo TissueLyser II (QIAGEN, EE.UU.) utilizando bolas de acero inoxidable, mediante 3 pulsos de 45 s a 30 Hz, y posterior centrifugación a 16200 x g (Sorvall ST 8R Centrifuge, Thermo Scientific, España) durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y congeló a -20 °C hasta el momento de su utilización.

##### 4.5.2. Procesamiento de hipocampos para el ensayo de biotilación de superficie de receptores de glutamato

El hipocampo extraído se incubó inmediatamente en solución de líquido cefalorraquídeo artificial (aLCR; NaCl 119 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mM, KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.3 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glucosa 11 mM, pH 7.4) durante 30 min, burbujeadado con carbógeno (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). A continuación, el tejido se incubó durante 45 min en solución de biotina (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin, ThermoFisher Scientific, España, 4 mM en aLCR). Tras 2 incubaciones de 15 min en solución de *quenching* (glicina 100 mM en aLCR), para detener la reacción de unión de la biotina, el

## MATERIALES Y MÉTODOS

tejido se homogenizó en un volumen fijo de 1 mL de tampón de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 mM, NaCl 15 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 mM,  $\text{CaCl}_2$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, Triton X-100 1 %, SDS 0.1 %, pH 7.4) suplementado con inhibidores de proteasas (1 %) y fosfatasas (5 %) en TissueLyser II tal como está descrito anteriormente. Para asegurar la completa solubilización del tejido en el tampón de lisis, se incubaron los homogenados en rotación durante 30 min a 4 °C. Por último, se centrifugaron las muestras a 14000 x g (Sorvall ST 8R Centrifuge, Thermo Scientific, España) durante 10 min a 4 °C y se conservó el sobrenadante con el lisado total del que se determinó su concentración proteica.

Se tomó una alícuota de la muestra conteniendo las proteínas biotiniladas (150 µg de proteína) y se incubó con 50 µL de solución de perlas con neutravidina conjugada (Pierce™ NeutrAvidin™ Agarose, ThermoFisher Scientific, España) durante 1 h a 4 °C. Tras esto, se procedió con 3 lavados a temperatura ambiente para precipitar los complejos de agarosa con la proteína biotinilada: se centrifugó la muestra a 500 x g (Hermle Z 400 K, Hermle Labortechnik GmbH, Alemania) durante 1 min, se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de buffer de lisis, se agitaron durante 5 min, tras lo que se repitió el lavado. Al finalizar los lavados, el precipitado contenía la muestra de proteínas biotiniladas, que se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

### 4.5.3. Zimografía en gel

La zimografía en gel se utilizó para la determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en hipocampo. La separación de las formas activa y proforma de ambas enzimas se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida al 8 %, conteniendo gelatina al 2 % como sustrato enzimático de dichas metaloproteasas.

Las muestras se diluyeron en proporción 3:1 en tampón de carga no reductor (Tris-HCl 0.5 M, SDS 10 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol, pH 6.8) y se calentaron durante 5 min a 37 °C. De cada muestra se cargó un total de 15 µg de proteína total. La electroforesis se desarrolló en condiciones de voltaje constante (120 V) durante 2 h.

Tras la electroforesis, los geles se sometieron a 3 lavados de 20 min en tampón de activación (Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  6 mM,  $\text{ZnCl}_2$  1,5 µM, pH 7.4), suplementado con Tween®-20 al 2.5 %, con el objetivo de eliminar la unión reversible del SDS a las proteínas y permitir su renaturalización y recuperación de la actividad enzimática. Posteriormente, se incubaron los geles en tampón de activación a 37 °C durante 7 días. Transcurrido este

tiempo, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad, España) y a continuación se destiñeron con una solución de ácido acético al 10 % y metanol al 40 %, lo que permitió visualizar bandas decoloradas debido a la ausencia de gelatina, correspondientes a la actividad enzimática de las metaloproteasas ensayadas. Las condiciones de tiempo de incubación y de lavado de los geles se establecieron en un experimento previo diseñado para tal fin, asegurando la proporcionalidad entre la concentración proteica, actividad enzimática e intensidad de decoloración del gel. Finalmente, los geles se escanearon y se procesaron las imágenes para obtener las bandas a analizar. La intensidad de las bandas correspondientes a la degradación de sustrato se cuantificó mediante el programa Image J Software versión 1.53r (NIH, EE.UU.).

#### 4.5.4. *Western blot*

Para determinar la expresión de proteínas en el hipocampo se utilizó la técnica de *western blot*. Con ello, analizamos receptores y transportadores de glutamato, factores de señalización de la ruta de BDNF, proteínas de la dinámica de fusión-fisión mitocondrial y enzimas antioxidantes.

Las muestras se diluyeron en tampón de carga reductor (Tris-HCl 0.5 M, SDS 10 %, glicerol 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol, pH 6.8) y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE utilizando geles de acrilamida de porcentaje entre 7 y 15 % en función del peso molecular de la proteína. La electroforesis se llevó a cabo en condiciones de voltaje constante (120 V).

Tras la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF, en condiciones de amperaje constante (200 mA). Para proteínas de bajo peso molecular (<100 kDa) se utilizó una transferencia semi-seca (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, EE.UU.) y las proteínas con alto peso molecular se sometieron a transferencia húmeda con un tampón compuesto de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % durante 2 h a 4 °C. La correcta transferencia de las proteínas a la membrana se comprobó mediante tinción con Rojo Ponceau.

Con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo, las membranas se bloquearon en TBS (Tris Base 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 7.5) suplementado con 5 % BSA o leche desnatada durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, para el reconocimiento de la proteína de interés, las membranas se incubaron con los

## MATERIALES Y MÉTODOS

correspondientes anticuerpos primarios durante 16 h a 4 °C, en agitación suave. Como control de carga se analizó la expresión de  $\beta$ -actina. Tras lavados en TBST (TBS con Tween®-20 0.1 %), las membranas se incubaron durante 1 h y a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano o, en el caso de la  $\beta$ -actina, con fluorocromo. En la Tabla 1 se describen las características y condiciones de uso de los anticuerpos primarios y secundarios empleados.

La inmunorreactividad de las bandas se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia para *western blot* (ECL Western Blotting Detection Kit®, o bien, ECL Plus Western blotting detection kit®, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) que permite la oxidación catalizada del luminol por acción de la peroxidasa de rábano (HRP, del inglés, *horseradish peroxidase*) acoplada a los anticuerpos secundarios, seguido de la exposición de las membranas al equipo de imagen Odyssey® XF Imaging System (LI-COR Inc., EE.UU.). La cuantificación de la densidad de las bandas se realizó utilizando el programa Image J Software versión 1.53r (NIH, EE.UU.). El valor de cada muestra se normalizó en referencia a la inmunorreactividad de la proteína  $\beta$ -actina, detectada en la misma membrana mediante el equipo Odyssey®, medido por fluorescencia a 700 nm.

**Tabla 1.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de *western blot*.

<b>Anticuerpos primarios</b>						
<b>Estudio</b>	<b>Proteína diana</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Bloqueo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
Señalización glutamatérgica	<b>EAAT2</b>	Conejo	1:1000	BSA	Abcam	ab41621
	<b>GluA1</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#13185
	<b>GluN2A</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#4205
	<b>GluN2B</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#4207
	<b>mGluR2</b>	Ratón	1:1000	BSA	Abcam	ab15672
Metaloproteasas	<b>MMP-9</b>	Conejo	1:1000	BSA	Millipore	AB19016
Fusión-fisión mitocondrial	<b>DRP-1</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#8570
	<b>Mitofusina 2</b>	Conejo	1:1000	Leche	Cell Signaling	#9482
	<b>OPA-1</b>	Conejo	1:1000	Leche	Abcam	ab42364
	<b>pDRP-1 Ser616</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#4494
Defensas antioxidantes	<b>Catalasa</b>	Conejo	1:1000	BSA	Calbiochem	219010
	<b>Hemooxigenasa-1</b>	Conejo	1:1000	BSA	Abcam	ab13243
	<b>NOX-2</b>	Conejo	1:1000	BSA	Abcam	ab129068
	<b>NQO-1</b>	Conejo	1:1000	BSA	Abcam	ab34173
	<b>SOD-1</b>	Conejo	1:1000	BSA	Abcam	ab16831
	<b>SOD-2</b>	Conejo	1:5000	BSA	Abcam	ab13533
Ruta de BDNF	<b>Akt</b>	Ratón	1:500	BSA	Santa Cruz	sc-5298
	<b>BDNF</b>	Conejo	1:500	Leche	Abcam	ab108319
	<b>CREB</b>	Ratón	1:1000	BSA	Cell Signaling	#9104
	<b>TrkB</b>	Ratón	1:1000	BSA	Santa Cruz	sc-377218
	<b>pAkt Ser473</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#9271
	<b>pCREB Ser133</b>	Conejo	1:1000	BSA	Cell Signaling	#9198
	<b>pTrkB Tyr816</b>	Conejo	1:1500	BSA	Millipore	ABN1381
Control de carga	<b><math>\beta</math>-actina</b>	Ratón	1:10000	BSA	Sigma-Aldrich	A5441

<b>Anticuerpos secundarios</b>					
<b>Proteína diana</b>	<b>Detección</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
<b>IgG de conejo</b>	Conjugado con HRP	Cabra	1:10000	Millipore	12-348
<b>IgG de ratón</b>	Conjugado con HRP	Cabra	1:10000	Calbiochem	401215
<b>IgG de ratón</b>	Conjugado con fluoróforo IRDye® 680RD	Cabra	1:10000	LI-COR Biosciences	926-68070

### 4.6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios de inmunohistoquímica se destinaron al análisis de supervivencia de linajes neurales de nueva generación y la supervivencia de neuronas inmaduras.

#### 4.6.1. Procesamiento de cerebros para la obtención de secciones hipocampales

Tras la sedación terminal del animal con pentobarbital sódico (Dolethal, 120 mg/kg i.p., Vetoquinol, España), se abrió la caja torácica y se realizó una punción cardiaca en el ventrículo izquierdo para acceder a su sistema circulatorio. A continuación, se procedió con un lavado con tampón fosfato 0.1 M (PB, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7.4) durante 5 min y se fijaron los tejidos con paraformaldehído (PFA, 4 % en PB 0.1 M; Panreac AppliChem, España) durante otros 5 min. Ambos procesos se realizaron con una bomba peristáltica de perfusión (Minipuls<sup>®</sup> 3, Gilson, España), a un flujo continuo de 18 mL/min. Se extrajo el cerebro completo y se incubó 16 h en PFA 4 % para asegurar la fijación completa del tejido. A continuación, se lavaron los cerebros 3 veces en PB 0.1 M y se incubaron en solución de sacarosa (30 % en PB 0.1 M) durante 24 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se almacenaron a -20 °C envueltos en Parafilm<sup>®</sup> hasta su utilización.

Los cerebros extraídos se adhirieron a un soporte metálico utilizando el pegamento Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura Finetek Europe B.V., Países Bajos) y se obtuvieron cortes coronales seriados de hipocampo de 30 µm en el criostato Leica CM1950 (Leica Microsystems, Alemania). Las coordenadas para acotar la región hipocampal se calcularon mediante un atlas anatómico de cerebro de ratón<sup>201</sup>, tomando como referencia la coordenada de la línea de Bregma desde -1.34 mm hasta -2.80 mm. Las secciones se almacenaron en solución crioprotectora (30 % glicerol, 40 % etilenglicol en PB 0.1 M) a -20 °C hasta su utilización para los experimentos de inmunohistoquímica.

#### 4.6.2. Supervivencia de células neurales de nueva formación: colocalización con BrdU

Dado que BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora en el ADN de células en división, es necesario desnaturalizar el ADN en un proceso denominado desenmascaramiento de antígeno, para exponer el nucleótido y que así pueda ser reconocido por el anticuerpo específicamente dirigido frente a él. Para ello, tras atemperar

las muestras durante 30 min y realizar 3 lavados de 5 min con PB 0.1 M para retirar los restos de solución crioprotectora, las secciones hipocampales se incubaron con HCl 2 N durante 30 min en baño de agua a 37 °C. Se lavaron 3 veces con PB 0.1 M y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente con tetraborato sódico 0.1 M a pH 8.5 neutralizando la reacción del HCl. Seguidamente, se realizaron otros 3 lavados con PB 0.1 M y se procedió a bloquear los tejidos, para evitar uniones inespecíficas, durante 1 h a temperatura ambiente en PB 0.1 M, 10 % suero normal de burro (NDS) y 0.1 % Triton X-100. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo primario dirigido frente a BrdU y el anticuerpo contra la proteína marcadora de linaje (NeuN, Iba-1 o GFAP), diluidos en buffer de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital. A continuación, tras lavados en buffer de bloqueo, los cortes hipocampales se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación orbital con el anticuerpo secundario, detectando la emisión del anticuerpo secundario para BrdU en color rojo (Alexa Fluor® 594) y en color verde (Alexa Fluor® 488) para los marcadores de linaje celular (Tabla 2). Para terminar, se volvieron a lavar los tejidos 5 veces durante 5 min con PB 0.1 M, tras lo que se extendieron los tejidos en un portaobjetos (SuperFrost Plus™, Thermo Fisher Scientific, Alemania) y se dejaron secar. Se añadió el medio de montaje Prolong™ suplementado con DAPI (ProLong™ Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen, España) y se cubrió la muestra (Epredia™ Cubreobjetos para microscopio Menzel-Gläser™, Thermo Fisher Scientific, Alemania) para su estudio y almacenamiento.

Para el análisis, se procedió al conteo del número total de células que coexpresaran BrdU junto con el marcador de linaje celular correspondiente, esto es, BrdU<sup>+</sup> / NeuN<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup> / Iba-1<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup> / GFAP<sup>+</sup>, expresado como porcentaje sobre la misma relación en el grupo control. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal (Leica TCS SP-8, Leica Microsystems, Alemania) y se procesaron mediante el programa ImageJ. El conteo de células doblemente positivas se realizó manualmente, en el giro dentado, en cada sexta sección coronal a lo largo de todo el hipocampo.

#### 4.6.3. Neurogénesis hipocampal: marcaje de neuronas inmaduras

Tras atemperar las muestras durante 30 min y realizar 3 lavados de 5 min con PB 0.1 M para retirar los restos de solución crioprotectora, las secciones hipocampales se bloquearon en PB 0.1 M, 5 % NDS y 0.3 % Triton X-100 durante 1 h a temperatura

## MATERIALES Y MÉTODOS

ambiente para evitar uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario anti-DCX diluido en buffer de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital. Tras 5 lavados de 5 min en PB 0.1 M, los cortes hipocampales se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación orbital con el anticuerpo secundario fluorescente (Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488, Thermo Fisher Scientific, Alemania), diluido en buffer de bloqueo (Tabla 2). Para terminar, se volvieron a lavar los tejidos 5 veces durante 5 min con PB 0.1 M y se incubaron con solución de DAPI (DAPI for nucleic acid staining, Sigma Aldrich, España) en proporción 1:10000 durante 2 min. Tras 5 lavados durante 5 min en PB 0.1 M, los tejidos se extendieron en un portaobjetos y se dejaron secar. Se añadió el medio de montaje Vectashield® (Vectashield® Antifade Mounting Medium, Vector, España) y se tapó la muestra con un cubreobjetos.

Para el análisis, se procedió al conteo del número total de células que fueran positivas para el marcaje de DCX, expresado como porcentaje sobre el grupo control. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de fluorescencia (ZEISS Axio Imager M2, Zeiss, Alemania) y el conteo se realizó en el giro dentado en cada sexta sección coronal a lo largo de todo el hipocampo, de forma manual.

**Tabla 2.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.

<b>Anticuerpos primarios</b>					
<b>Estudio</b>	<b>Proteína diana</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
Supervivencia de nuevas células	<b>BrdU</b>	Rata	1:1000	Abcam	ab6326
	<b>GFAP</b>	Conejo	1:5000	Abcam	ab7260
	<b>Iba-1</b>	Conejo	1:5000	Wako	OPI-19741
	<b>NeuN</b>	Conejo	1:5000	Abcam	ab177487
Neuronas inmaduras	<b>DCX</b>	Conejo	1:1000	Abcam	ab18723

<b>Anticuerpos secundarios</b>					
<b>Proteína diana</b>	<b>Detección</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Ref.</b>
<b>IgG de conejo</b>	Alexa Fluor® 488	Burro	1:1000 (GFAP/Iba-1/NeuN) 1:2000 (DCX)	Invitrogen	A21206
<b>IgG de conejo</b>	Alexa Fluor® 594	Burro	1:1000	Invitrogen	A21207
<b>IgG de rata</b>	Alexa Fluor® 594	Burro	1:500	Invitrogen	A21209

## 5. Análisis estadístico

El tamaño inicial de los grupos ( $n = 8$ ) se seleccionó en base a nuestra experiencia previa para asegurar una significación estadística, considerando la posible pérdida de ratones debido a la aplicación de criterios humanitarios de punto final (observación de signos físicos distintos a los producidos por la intoxicación por EtOH) o valores atípicos (determinados por el método de desviación estudentizada extrema o prueba ROUT, con nivel de significancia de  $Q = 1 \%$ ). Estas condiciones fueron los únicos criterios de exclusión empleados y explican las diferencias en el tamaño de los grupos.

Se utilizó el programa PRISM 8.0 (GraphPad Software Inc., EE.UU.) para el análisis de resultados. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y se consideró el umbral de significación estadística un valor de  $p < 0.05$ . Se realizó el test ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey, para comparar más de dos grupos con una sola variable independiente; el test ANOVA de dos vías, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey, para comparar dos grupos con dos factores independientes, siendo dichos factores la exposición a EtOH y el tratamiento con DIM; el test ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de una prueba *post-hoc* de Sidak, para comparar dos grupos con dos factores independientes, siendo dichos factores el sexo del animal y el tiempo; y el test ANOVA de dos vías de análisis de efectos mixtos, seguido de una prueba *post-hoc* de Sidak, para comparar dos grupos con dos factores independientes, siendo dichos factores el tratamiento con DIM y el tiempo. Los análisis *post-hoc* solo se llevaron a cabo cuando se alcanzó el umbral de significación estadística y no se detectó una variación significativa en la homogeneidad.



---

# Resultados

---



# RESULTADOS

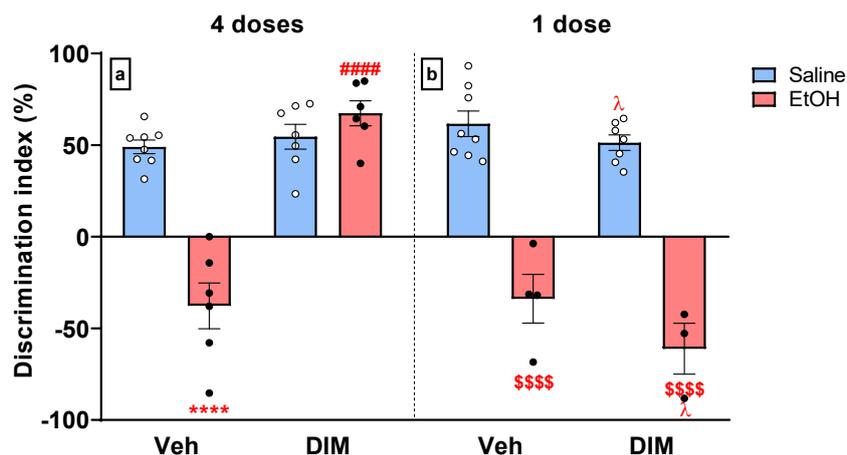
## 1. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la memoria de reconocimiento

### 1.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA MEMORIA A 20 H TRAS LA ÚLTIMA EXPOSICIÓN A ETANOL EN RATONES MACHO Y HEMBRA

En primer lugar, se procedió a evaluar el impacto de la exposición a EtOH tipo *binge* sobre la función de memoria de reconocimiento, así como el efecto del tratamiento con DIM sobre las posibles alteraciones inducidas por el EtOH. Se realizó la prueba conductual NOR 20 h tras la última exposición a EtOH en ratones macho que recibieron bien 4 dosis de DIM en los cuatro últimos días de protocolo o bien una única dosis el último día de protocolo (ver Materiales y métodos, Sección 3.2, Figuras 8a, b).

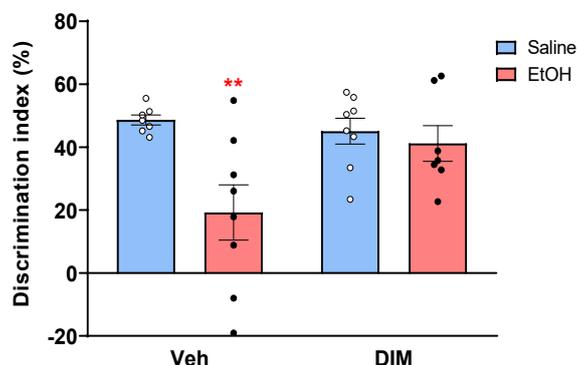
El ANOVA de dos vías mostró que el protocolo *binge* provocó un efecto significativo por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1, 23} = 43.10, p < 0.0001$ ). El test *post-hoc* de Tukey mostró una disminución significativa del índice de discriminación (indicador del estado de la memoria de reconocimiento) en los animales sometidos al *binge* de EtOH frente a los animales control ( $p < 0.0001$ ), mientras que el tratamiento con 4 dosis de DIM prevenía dicha disminución ( $p < 0.0001$  vs. EtOH + Veh) (Fig. 13a).

Al reducir el número de dosis de DIM a una única dosis, administrada el último día del protocolo, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo producido por la exposición a EtOH tipo *binge* ( $F_{1, 18} = 136.4, p < 0.0001$ ), así como por el tratamiento con DIM ( $F_{1, 18} = 4.453, p = 0.049$ ), pero no de la interacción de ambos factores. Los animales que recibieron dosis de EtOH muestran un índice de discriminación menor que los tratados con salino. A su vez, el tratamiento con DIM también produjo una reducción del índice de discriminación (Fig. 13b).



**Figura 13.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la memoria de reconocimiento 20 h post-*binge*. Se muestra el efecto del EtOH y el tratamiento con (a) 4 dosis de DIM o (b) 1 única dosis de DIM sobre el índice de discriminación en la prueba NOR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n = 3-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{ssss}p < 0.0001$  vs. Saline; efecto principal de DIM  $^{\lambda}p < 0.05$  vs. Vehicle; seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $^{****}p < 0.0001$  vs. Saline + Vehicle y  $^{####}p < 0.0001$  vs. EtOH + Vehicle.

Seguidamente, y teniendo en cuenta el resultado en machos con el número de dosis de DIM, procedimos a evaluar el efecto sobre la memoria hipocampal del protocolo *binge* de EtOH y del tratamiento con 4 dosis de DIM en ratones hembra. El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo sobre el índice de discriminación inducido por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1, 26} = 4.715, p = 0.039$ ). El test *post-hoc* de Tukey mostró una disminución significativa del índice de discriminación en los animales sometidos al *binge* de EtOH frente a los animales control ( $p = 0.008$ ), mientras que el tratamiento con 4 dosis de DIM mostraba una tendencia a prevenir dicha disminución ( $p = 0.062$ ; Fig. 14).



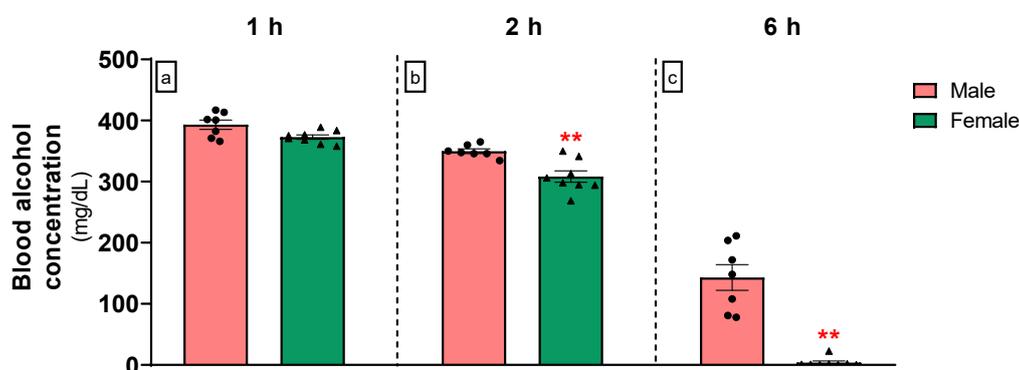
**Figura 14.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la memoria de reconocimiento 20 h post-*binge* en ratones hembra. Se muestra el efecto del EtOH y el tratamiento con 4 dosis de DIM administradas sobre el índice de discriminación en la prueba NOR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $^{**}p < 0.01$  vs. Saline + Vehicle.

### 1.1.1. Determinación de los niveles plasmáticos de etanol en machos y hembras

Los resultados en hembras indicaron un efecto perjudicial en la memoria tras la exposición al *binge*, pero la disminución observada en el índice de discriminación fue claramente menor que la obtenida en los animales macho. Además, el efecto neuroprotector de DIM en ratones hembra no llegó a ser significativo, como en el caso de los machos. Es por ello que, en un experimento adicional, decidimos estudiar posibles diferencias entre sexos en la metabolización del EtOH. Realizamos una curva temporal para medir el EtOH en plasma en animales macho y hembra a 1, 2 y 6 h tras la última exposición a EtOH (Fig. 15).

Los resultados mostraron que, a 1 h tras la última administración, los animales macho alcanzaron una concentración de  $393 \pm 8$  mg/dL, mientras que para las hembras este valor fue de  $373 \pm 4$  mg/dL (Fig. 15a). A las 2 h tras la última inyección, estos valores habían descendido hasta  $350 \pm 4$  mg/dL y  $308 \pm 9$  mg/dL para machos y hembras, respectivamente (Fig. 15b). Por último, a 6 h tras la última exposición a EtOH, los niveles de EtOH en plasma de los machos se hallaban en  $143 \pm 21$  mg/dL, mientras que para las hembras los niveles se hallaban por debajo del límite de detección (Fig. 15c).

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas manifestó un efecto de la interacción entre el factor tiempo y el factor sexo ( $F_{2, 26} = 28.28$ ,  $p < 0.0001$ ). El test *post-hoc* de Sidak de comparaciones múltiples indicó que no había diferencias entre machos y hembras en los niveles plasmáticos de EtOH a 1 h tras la última inyección (Fig. 15a). Sin embargo, sí se percibieron diferencias entre ambos sexos tanto a 2 como a 6 h tras la última exposición ( $p = 0.008$  y  $p = 0.002$ , respectivamente; Fig. 15b, c). Estos resultados confirmaron que el aclaramiento del EtOH en plasma ocurre más rápidamente en ratones hembras que en machos.



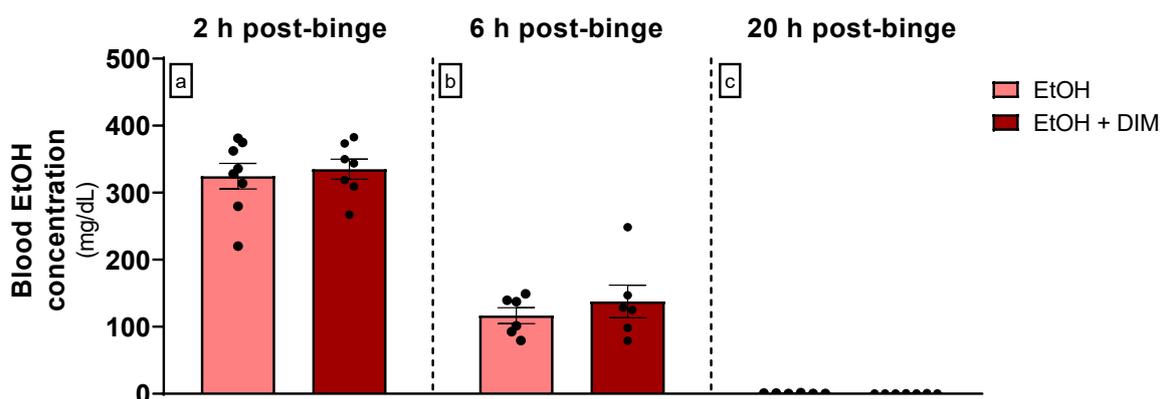
**Figura 15.** Niveles plasmáticos de EtOH en ratones macho y hembra. Se muestra la concentración plasmática de EtOH de ratones macho y hembra a (a) 1 h, (b) 2 h y (c) 6 h tras la última administración de EtOH. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del *post-hoc* de Sidak, cuando hubo efecto de la interacción:  $**p < 0.01$  vs. Male.

## RESULTADOS

### 1.1.2. Efecto de DIM en el metabolismo del etanol

Para descartar que el efecto de DIM sobre la prevención del daño en memoria se debiese a una alteración del metabolismo del EtOH, se determinó la concentración de EtOH en plasma a 2, 6 y 20 h tras la última inyección de EtOH en ratones macho tratados con 4 dosis de DIM o de su vehículo (Fig. 16). Los resultados mostraron que, a las 2 h, los animales que recibieron solo EtOH mantenían una concentración de  $325 \pm 19$  mg/dL, mientras que para los que recibieron EtOH + DIM este valor fue de  $335 \pm 15$  mg/dL (Fig. 16a). A las 6 h, estos valores habían descendido hasta  $117 \pm 12$  mg/dL y  $138 \pm 24$  mg/dL, respectivamente (Fig. 16b). Por último, a 20 h tras la última exposición a EtOH, los niveles de EtOH en plasma eran prácticamente indetectables en los dos grupos ( $0.87 \pm 0.18$  mg/dL y  $0.62 \pm 0.08$ , respectivamente; Fig. 16c).

El análisis de efectos mixtos indicó un efecto del factor tiempo ( $F_{2,34} = 254$ ,  $p < 0.0001$ ), pero no de DIM ni de la interacción de factores. Por ello, concluimos que el tratamiento con DIM no modificó la velocidad de metabolización del EtOH.



**Figura 16.** Efecto de DIM sobre la velocidad de metabolización del EtOH. Se muestra la concentración plasmática de EtOH de ratones tratados con DIM o su vehículo a (a) 2 h, (b) 6 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM (n = 6-8). El análisis estadístico se realizó empleando el análisis de efectos mixtos.

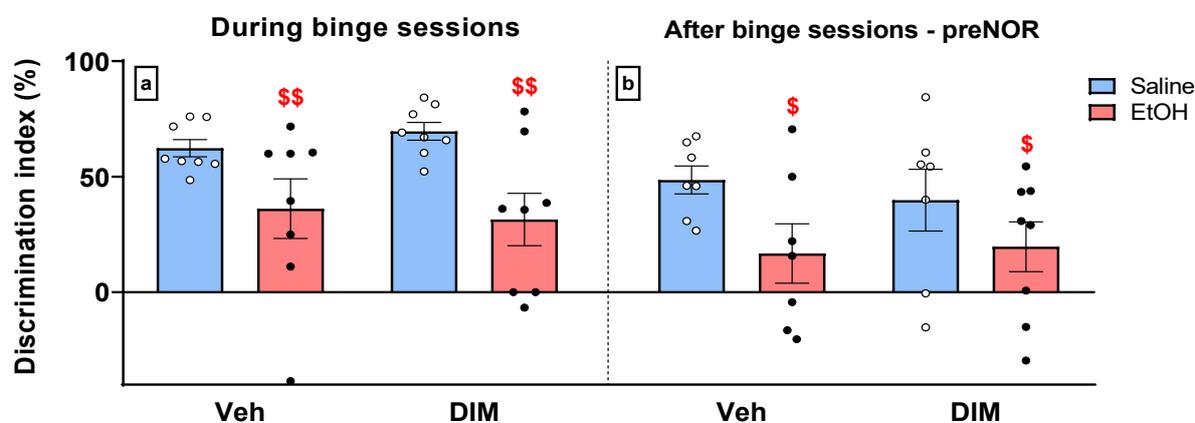
### 1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 4 DOSIS DE DIM EN LA MEMORIA A 7 DÍAS TRAS LA ÚLTIMA EXPOSICIÓN A ETANOL

Finalmente, procedimos a evaluar si el efecto perjudicial sobre la memoria de reconocimiento se extendía más allá de las 20 h post-binge, para lo cual realizamos el test NOR 7 días tras la finalización del protocolo. Además, dado que previamente observamos que el efecto protector de DIM depende del número de dosis administradas, quisimos valorar si el momento de administración también resultaba determinante. Para ello, el tratamiento con DIM

fue administrado en un grupo de animales durante los cuatro últimos días de protocolo *binge*, mientras que un segundo grupo recibió el tratamiento los cuatro días previos a la realización del test NOR (ver Materiales y métodos, Sección 3.2, Figuras 8c, d).

El ANOVA de dos vías mostró que, a 7 días tras la última exposición y con el tratamiento de DIM administrado durante las sesiones de *binge*, la interacción de la administración de EtOH y DIM no provocó ningún efecto sobre la función de memoria. Sin embargo, sí se produjo un descenso significativo sobre el índice de discriminación como efecto del EtOH ( $F_{1,28} = 12.83$ ,  $p = 0.001$ ; Fig. 17a).

Igualmente, cuando el tratamiento con DIM se desplazó a los 4 días previos a la realización del test NOR a 7 días, la interacción de EtOH y DIM no provocó ningún cambio en el índice de discriminación. De nuevo, tampoco se observó efecto por el tratamiento con DIM, pero sí por la exposición a EtOH ( $F_{1,25} = 5.416$ ,  $p = 0.028$ ; Fig. 17b). Estos resultados indicaron que el déficit de memoria inducido por la exposición a EtOH tipo *binge* se mantuvo, al menos, hasta 7 días más tarde, pero que administrado en los días previos a realizar la prueba el compuesto DIM ya no ejercía su efecto neuroprotector.



**Figura 17.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la memoria de reconocimiento 7 días *post-binge*. Se muestra el efecto sobre el índice de discriminación en la prueba NOR del *binge* de EtOH y el tratamiento con 4 dosis de DIM administradas (a) durante el protocolo *binge* o (b) los 4 días previos al NOR. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal de EtOH  $^{\$}p < 0.05$  y  $^{ss}p < 0.01$  vs. Saline.

En vista a los resultados obtenidos en el bloque de experimentos de conducta para evaluar la función de memoria tras el *binge* múltiple de EtOH y los efectos de DIM sobre la misma, se decidió proceder con los siguientes experimentos utilizando el paradigma de administración de 4 dosis de DIM durante los 4 últimos días del protocolo de *binge* múltiple (ver Materiales y

## RESULTADOS

métodos, Sección 3.2, Figura 8a). Para todas las determinaciones bioquímicas que se detallan a continuación, la región cerebral explorada fue el hipocampo, siempre en animales macho y a los puntos temporales que se indica en cada apartado.

### **2. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la expresión de componentes del sistema glutamatérgico**

La contribución del sistema glutamatérgico a los procesos de memoria y plasticidad es esencial. Por ello, decidimos analizar las posibles alteraciones en la expresión de los principales receptores de glutamato, esto es, receptores ionotrópicos NMDA (subunidades GluN2A y GluN2B) y AMPA (subunidad GluA1), receptor metabotrópico mGlu2; y el transportador astrocítico de glutamato EAAT2. Se estudiaron estos marcadores mediante *western blot* en un curso temporal que abarca 1, 3 y 20 h tras la última administración de EtOH.

#### **2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NMDA**

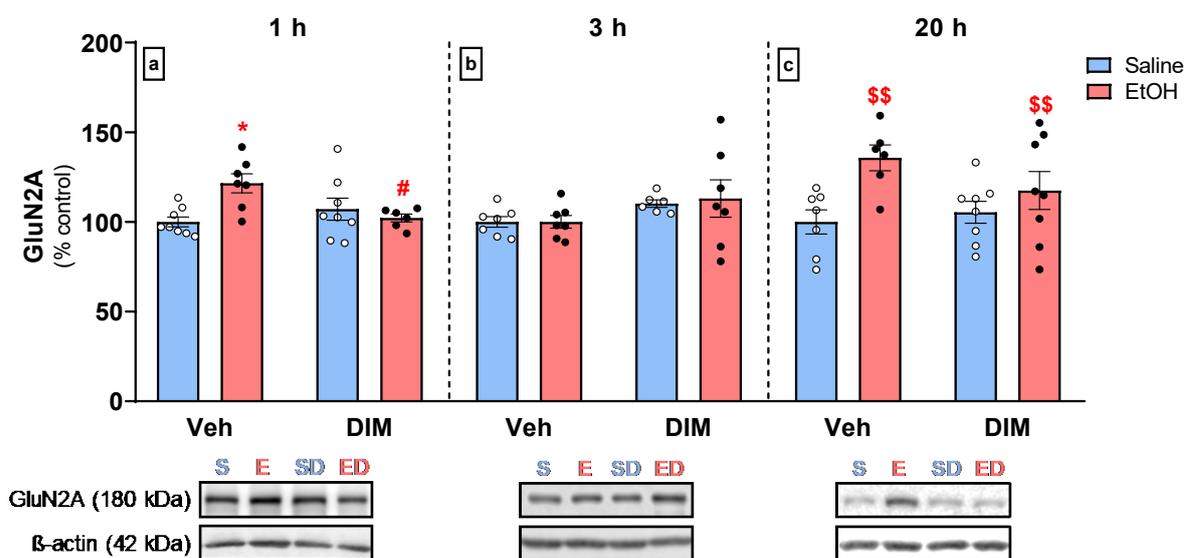
El receptor NMDA se encuentra altamente expresado en el cerebro y está implicado en procesos de LTP y LTD, establecimiento de memoria y aprendizaje. La composición heteromérica del receptor variará las características estructurales y funcionales del receptor, y de ahí surge la importancia de la dinámica de cambio entre subunidades. Por ello, se estudió la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B.

##### **2.1.1. Subunidad 2A del receptor NMDA**

A 1 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en la expresión total de GluN2A por la interacción EtOH y DIM ( $F_{1,25} = 8.156$ ,  $p = 0.009$ ). El test *post-hoc* de Tukey reveló un aumento significativo de la expresión de GluN2A en los animales que recibieron dosis de EtOH frente a los animales control ( $p = 0.013$ ), mientras que el tratamiento con DIM prevenía este efecto ( $p = 0.044$ ) (Fig. 18a).

A 3 h post-*binge*, no se observó ninguna alteración en la expresión total de GluN2A por la interacción de EtOH y DIM, ni por los efectos principales de la exposición a EtOH o el tratamiento con DIM (Fig. 18b).

Por último, a 20 h post-*binge*, el análisis estadístico manifestó cambios en la expresión total de GluN2A inducidos por el efecto principal del EtOH ( $F_{1,25} = 8.7, p = 0.007$ ), que produjo una elevación en los niveles de expresión de GluN2A en los animales expuestos a la droga. Ni el tratamiento con DIM ni la interacción de EtOH y DIM produjeron alteraciones en la concentración de GluN2A (Fig. 18c).



**Figura 18.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión de la subunidad 2A del receptor NMDA en el hipocampo. Se muestra la expresión de GluN2A (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 6-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{**}p < 0.01$  vs. Saline; seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $*p < 0.05$  vs. Saline + Vehicle y  $*p < 0.05$  vs. EtOH + Vehicle

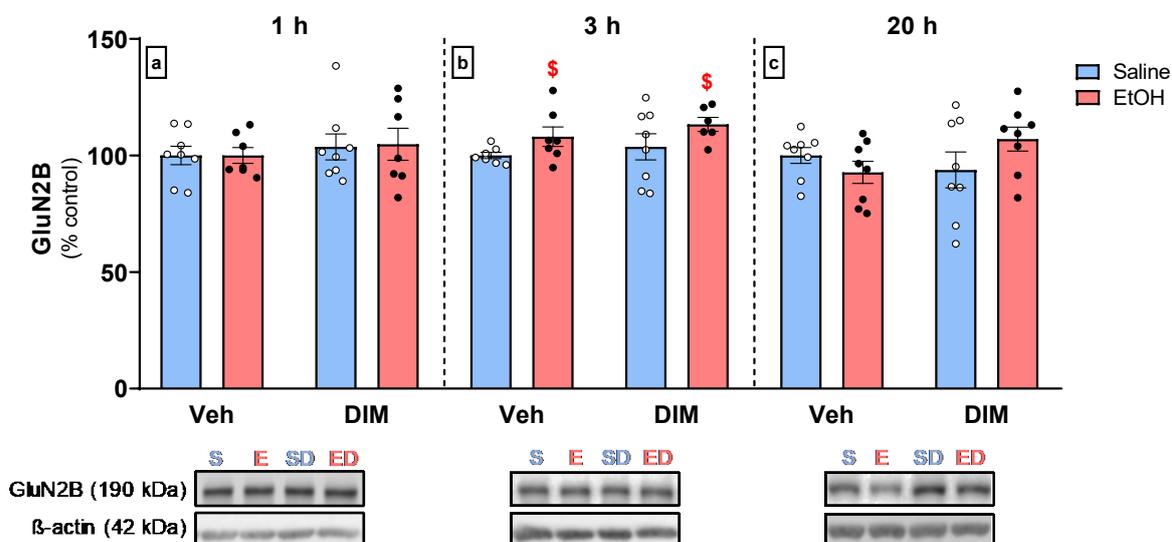
### 2.1.2. Subunidad 2B del receptor NMDA

A 1 y 20 h post-*binge*, no se observó ninguna alteración significativa en la expresión total de GluN2B por la interacción de EtOH y DIM, ni por el efecto principal de la exposición a EtOH o del tratamiento con DIM (Fig. 19a, c).

A 3 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró que la interacción de EtOH y DIM no produjo ningún efecto sobre la expresión total de GluN2B. En cuanto a los efectos principales, se observó un aumento de la concentración de GluN2B inducida por la exposición a EtOH ( $F_1,$

## RESULTADOS

$_{24} = 4.6$ ,  $p = 0.042$ ), mientras que el tratamiento con DIM no modificó los niveles de esta subunidad (Fig. 19b).



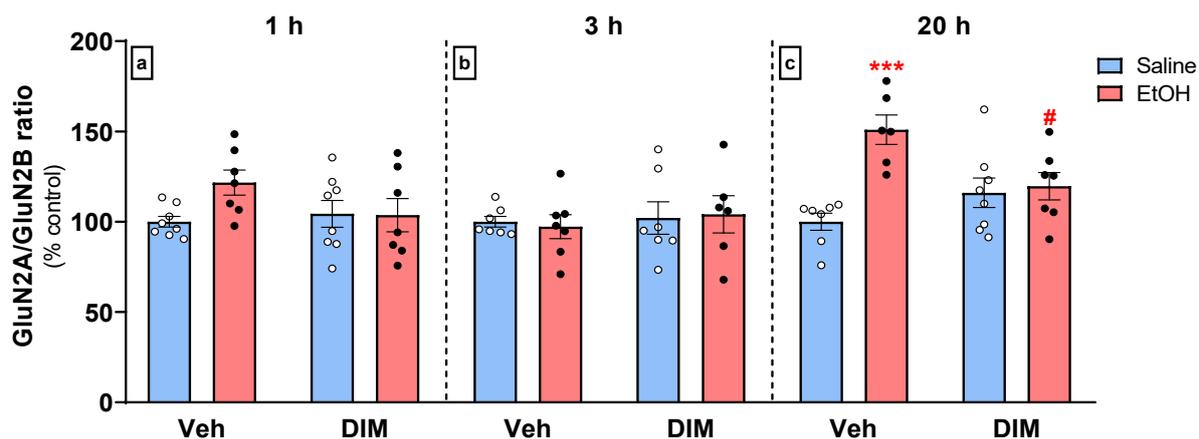
**Figura 19.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión de la subunidad 2B del receptor NMDA en el hipocampo. Se muestra la expresión de GluN2B (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 6-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{\$}p < 0.05$  vs. Saline.

### 2.1.3. Ratio GluN2A/GluN2B

Además, se analizó la ratio entre ambas subunidades, ya que la composición heteromérica del receptor puede variar tras la exposición a diversos estímulos y modificar así su respuesta.

A 1 h y 3 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías no mostró ninguna alteración en la ratio GluN2A/GluN2B por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 20a, b).

No obstante, sí se observaron cambios en la ratio a 20 h post-*binge*. El análisis estadístico reveló un efecto significativo en la ratio GluN2A/GluN2B por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,24} = 10.22$ ,  $p = 0.004$ ). El test *post-hoc* de Tukey evidenció un aumento significativo de la ratio GluN2A/GluN2B en los animales que recibieron dosis de EtOH frente a los animales control ( $p = 0.0005$ ). Sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento con DIM tras la exposición a EtOH mostraron una prevención del aumento de la ratio comparados a los que recibieron el vehículo ( $p = 0.038$ ) (Fig. 20c).



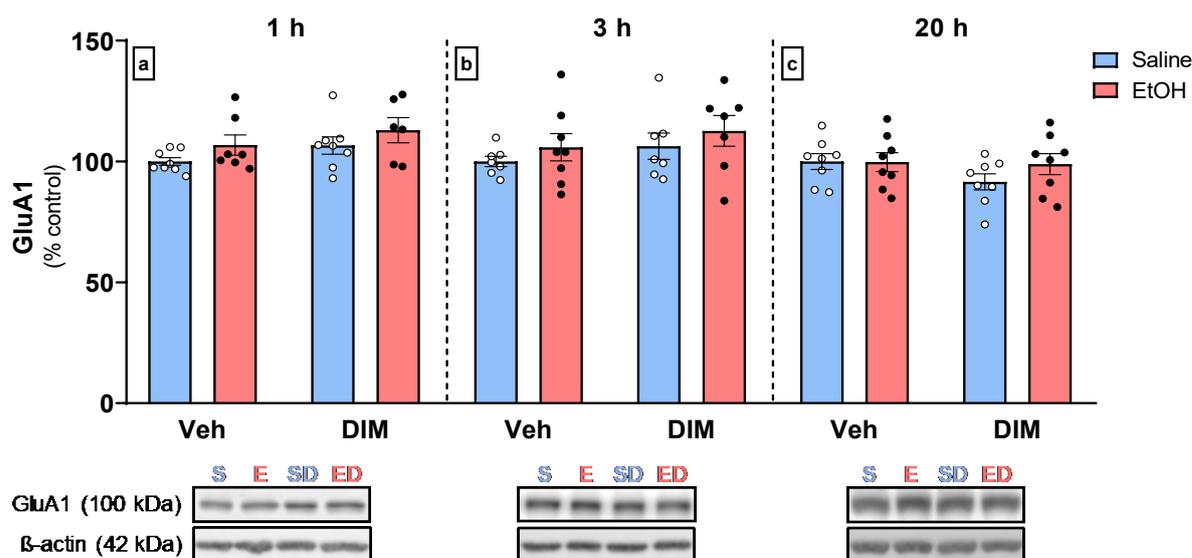
**Figura 20.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la proporción de las subunidades 2A y 2B del receptor NMDA en el hipocampo. Se muestra la ratio GluN2A/GluN2B (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 6-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción: \*\*\* $p < 0.001$  vs. Saline + Vehicle y # $p < 0.05$  vs. EtOH + Vehicle.

## 2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR AMPA

El receptor AMPA es el primer tipo de canal ionotrópico que responde a la unión con glutamato y está igualmente implicado en plasticidad sináptica que los receptores NMDA, para lo cual se ha visto que la subunidad GluA1 de este receptor es fundamental.

A 1, 3 y 20 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías no mostró ninguna alteración en la expresión total de la subunidad GluA1 del receptor AMPA por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de EtOH ni por el tratamiento con DIM (Fig. 21a, b, c).

## RESULTADOS



**Figura 21.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión del receptor AMPA en el hipocampo. Se muestra la expresión de GluA1 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM (n = 6-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías.

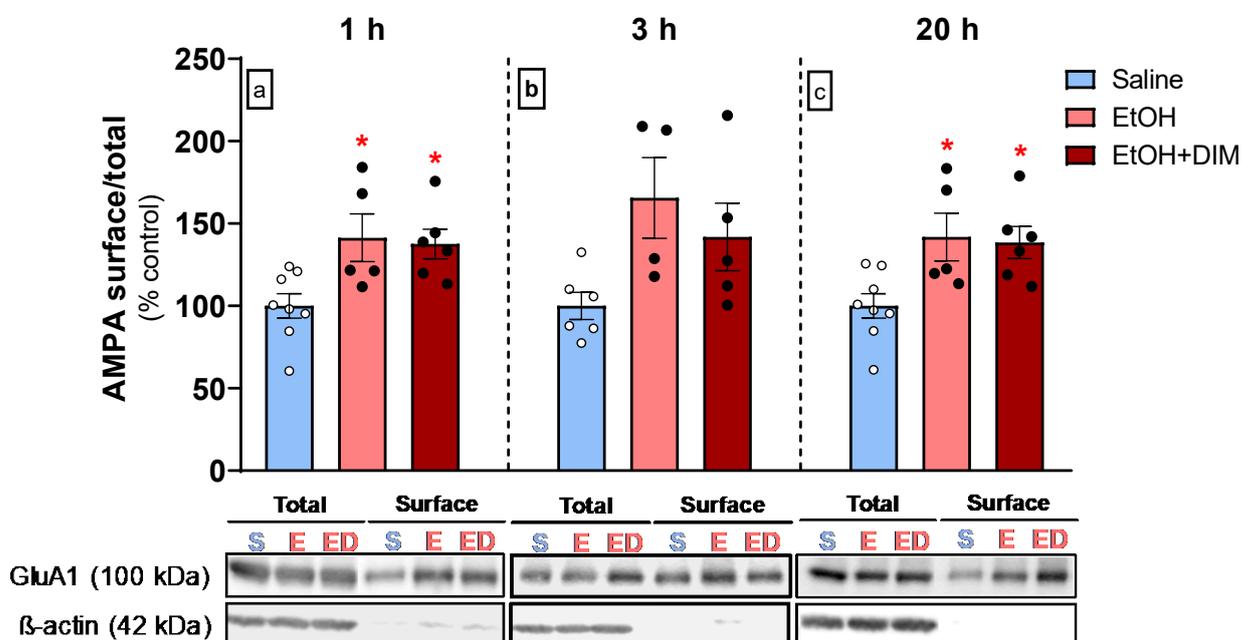
### 2.2.1. Efecto del tratamiento con DIM sobre el tráfico a membrana del receptor AMPA

A pesar de que la expresión total del receptor AMPA en el hipocampo no se vio modificada por la exposición al *binge* de EtOH ni por el tratamiento con DIM, quisimos comprobar si la incorporación de este receptor a la membrana de neuronas hipocampales sufrió alguna alteración. Para ello, realizamos un experimento de biotilación de superficie, en el que usamos biotina para marcar proteínas presentes en la superficie celular, que luego se precipitaron y se ensayaron por *western blot*. El tráfico a membrana del receptor AMPA se analizó a 1, 3 y 20 h post-*binge* como una relación entre la concentración del receptor en la superficie celular *versus* la concentración en el homogenado hipocampal total (ratio AMPA superficie/total).

A 1 h post-*binge*, el ANOVA de una vía reflejó un cambio estadísticamente significativo en la concentración de receptores AMPA en membrana ( $F_{2,16} = 5.921$ ,  $p = 0.011$ ). El test *post-hoc* de Tukey mostró que los animales expuestos a EtOH mostraban una elevación de la presencia del receptor AMPA en la membrana en comparación con los animales control, independientemente de si recibieron el tratamiento de DIM ( $p = 0.031$ ) o su vehículo ( $p = 0.024$ ). El tratamiento con DIM no produjo ningún efecto sobre este aumento (Fig. 22a).

A 3 h post-*binge*, aunque el ANOVA de una vía no reveló cambios estadísticamente significativos, se podía observar una tendencia al alza en la concentración del receptor AMPA en la membrana en los animales tratados con EtOH ( $p = 0.051$  vs. Saline), no así en los que recibieron dosis de DIM ( $p = 0.209$  vs. Saline; Fig. 22b).

Por último, a 20 h post-*binge*, los resultados volvieron a ser similares a los obtenidos a 1 h. El análisis ANOVA manifestó diferencias significativas ( $F_{2,16} = 5.872$ ,  $p = 0.012$ ) y, de nuevo, tanto los animales expuestos a EtOH ( $p = 0.026$ ) como los cotratados con DIM ( $p = 0.031$ ) mostraban un aumento de la incorporación del receptor AMPA en la membrana neuronal con respecto a los animales control, mientras que el tratamiento con DIM no prevenía este aumento ( $p = 0.974$  vs. EtOH) (Fig. 22c).



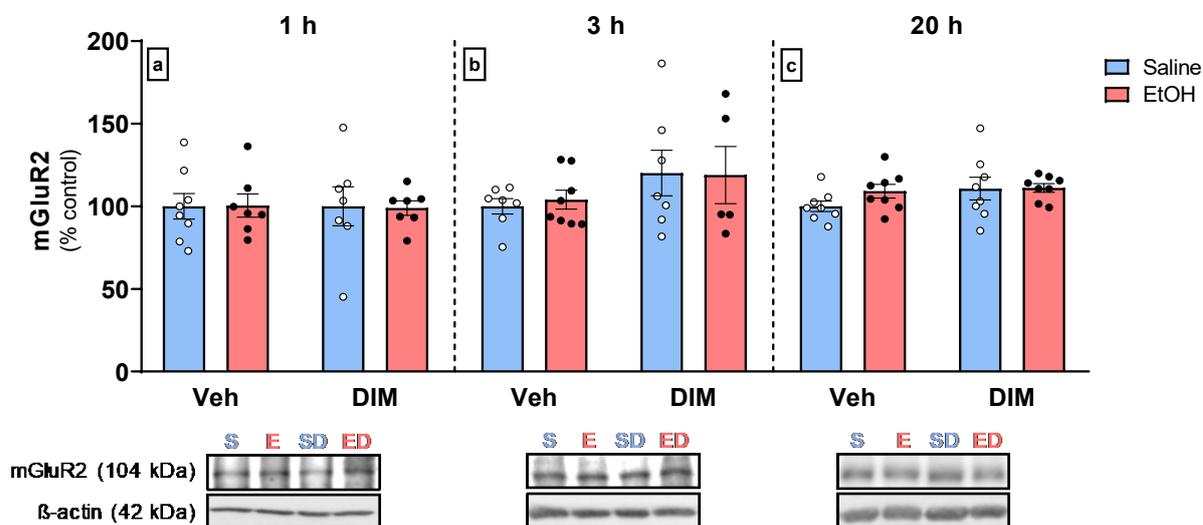
**Figura 22.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre el tráfico a membrana del receptor AMPA en el hipocampo. Se muestra la relación superficie/total de la concentración de GluA1 del receptor AMPA (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 4-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de una vía, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo diferencia de medias: \* $p < 0.05$  vs. Saline + Vehicle.

### 2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR METABOTRÓPICO mGLU2

Analizamos también la expresión del receptor metabotrópico mGlu2. Si bien su implicación en memoria no está tan estudiada como la de los receptores ionotrópicos, se sabe que es un factor clave en la regulación de la transmisión glutamatérgica.

## RESULTADOS

A todas las horas estudiadas, el análisis estadístico indicó que no hubo ninguna alteración en la expresión total del receptor mGlu2 por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 23a, b, c).



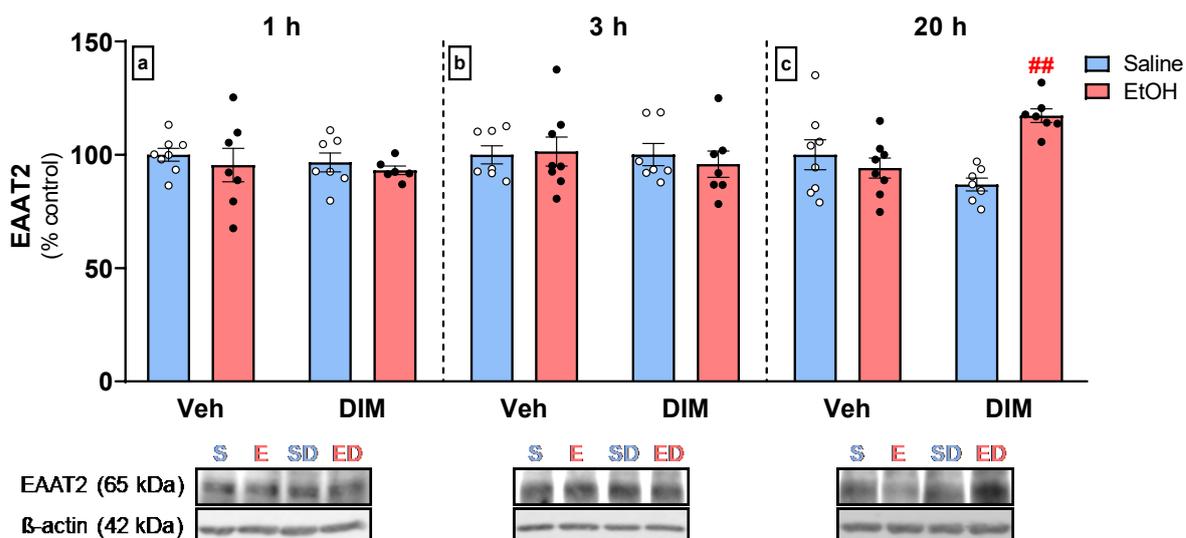
**Figura 23.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión del receptor mGlu2 en el hipocampo. Se muestra la expresión de mGluR2 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías.

### 2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR EAAT2

La última proteína implicada en la homeostasis del glutamato estudiada fue el transportador astrocítico EAAT2. Su principal función es la recaptación del glutamato de la hendidura sináptica, para que sea convertido a glutamina en el astrocito y devuelto a la neurona para su reciclaje nuevamente a glutamato.

A 1 h y 3 h post-*binge*, no se observaron diferencias significativas en la expresión total del transportador EAAT2 por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 24a, b).

No obstante, a 20 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró que la interacción de EtOH y DIM produjo un efecto significativo en la expresión total del transportador EAAT2 ( $F_{1,26} = 15.02$ ,  $p = 0.001$ ). El test *post-hoc* de Tukey reveló un aumento significativo de la expresión de EAAT2 en los animales que fueron tratados con DIM tras la exposición a EtOH frente a los que recibieron su vehículo ( $p = 0.009$ ) (Fig. 24c).



**Figura 24.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión del transportador EAAT2 en el hipocampo. Se muestra la expresión de EAAT2 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM (n = 6-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $^{##}p < 0.01$  vs. EtOH + Vehicle.

### 3. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en las metaloproteasas 2 y 9

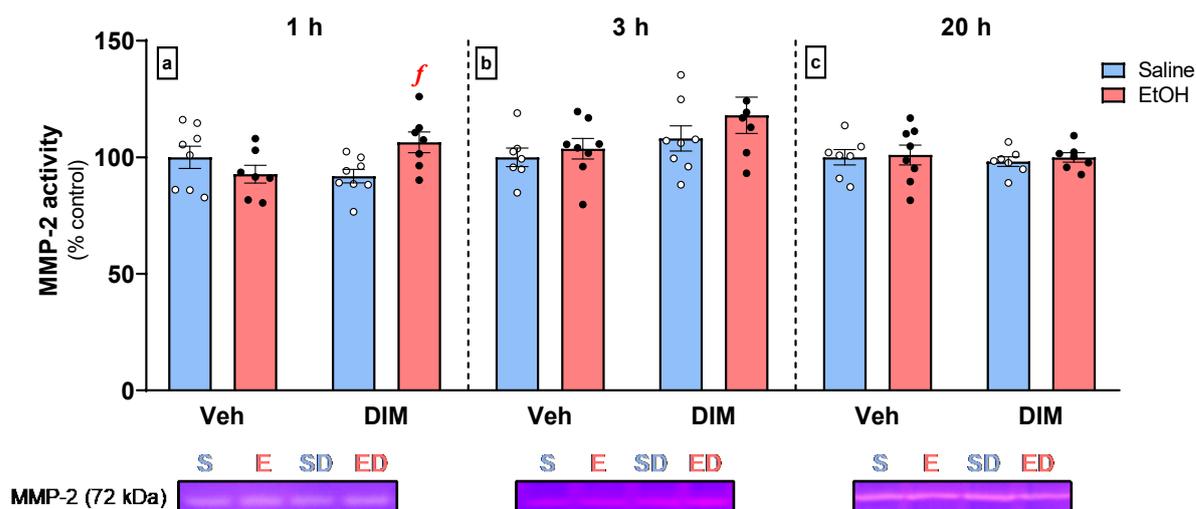
El estudio de la actividad de las metaloproteasas 2 y 9 se llevó a cabo dada su implicación en plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria. Para ello, se empleó la técnica de zimografía en gel en un curso temporal que abarca 1, 3 y 20 h tras la última administración de EtOH.

#### 3.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE MMP-2

En el curso temporal estudiado, para MMP-2 se encontraron diferencias a 1 post-*binge*. Se observó una alteración de la actividad degradativa de MMP-2 por la interacción de EtOH y DIM (F1, 26 = 7.222, p = 0.012). El test *post-hoc* de Tukey no reveló diferencias significativas entre grupos (Fig. 25a).

Por otro lado, ni a 3 ni a 20 h post-*binge* se observó ninguna alteración estadísticamente significativa en la actividad degradativa de MMP-2 (Fig. 25b, c).

## RESULTADOS



**Figura 25.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la actividad de MMP-2 en el hipocampo. Se muestran los niveles de actividad de MMP-2 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto de la interacción  $f$   $p < 0.05$ ; seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción.

### 3.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE MMP-9

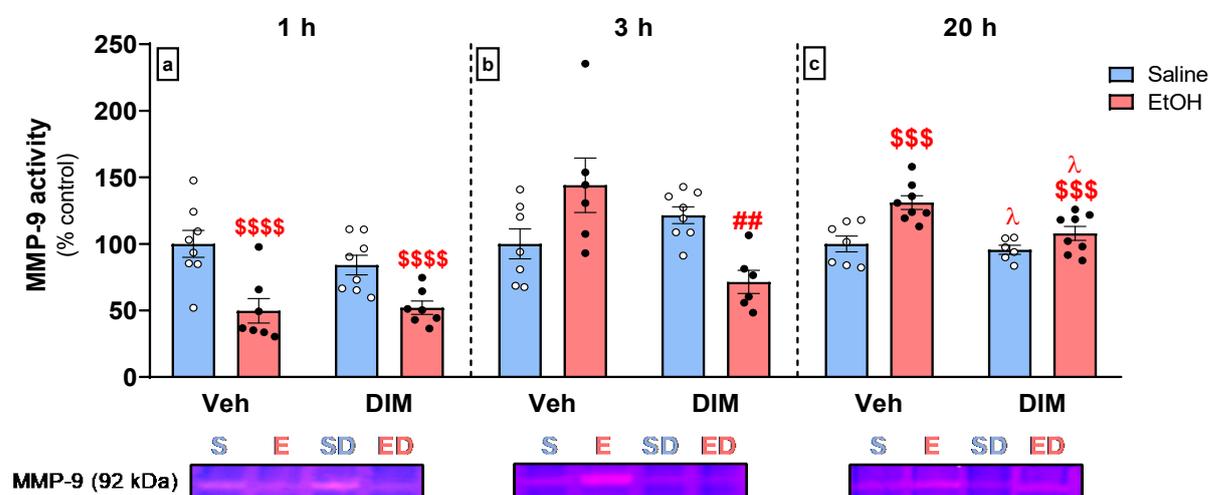
#### 3.2.1. Efecto del tratamiento con DIM sobre la actividad proteolítica de MMP-9

A 1 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró que la interacción de EtOH y DIM no causó ningún efecto sobre la actividad degradativa de MMP-9. Tampoco se encontró alteración por el tratamiento con DIM, pero sí por el efecto principal del EtOH ( $F_{1,26} = 24.57$ ,  $p < 0.0001$ ), observándose una marcada reducción en los niveles de actividad de MMP-9 (Fig. 26a).

A 3 h post-*binge*, el análisis estadístico reveló una alteración de la actividad degradativa de MMP-9 por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,23} = 15.18$ ,  $p = 0.001$ ). El test *post-hoc* de Tukey reveló una disminución de la actividad de MMP-9 en los animales tratados con DIM tras la exposición a EtOH frente a los que solo recibieron EtOH ( $p = 0.003$ ). Así mismo, se observó una tendencia al alza no estadísticamente significativa de la actividad de MMP-9 en los animales que recibieron dosis de EtOH frente a los animales control ( $p = 0.079$ ) (Fig. 26b).

Por último, a 20 h post-*binge*, se apreció un leve efecto de la interacción de EtOH y DIM, aunque dicha tendencia no fue significativa ( $F_{1,25} = 3.218$ ,  $p = 0.085$ ). El análisis de los efectos principales, por su parte, sí reveló cambios en la actividad de MMP-9 tanto por la exposición a EtOH ( $F_{1,25} = 17.20$ ,  $p = 0.0003$ ) como por el tratamiento con DIM ( $F_{1,25} = 6.922$ ,  $p = 0.014$ ). Los resultados evidenciaron un aumento de la actividad de MMP-9 en los animales que recibieron

dosis de EtOH, independientemente de si fueron tratados con DIM o con su vehículo. No obstante, en los animales cotratados con EtOH y DIM, se podría considerar que el aumento observado fue menor al mostrado por los que solo recibieron EtOH (Fig. 26c).

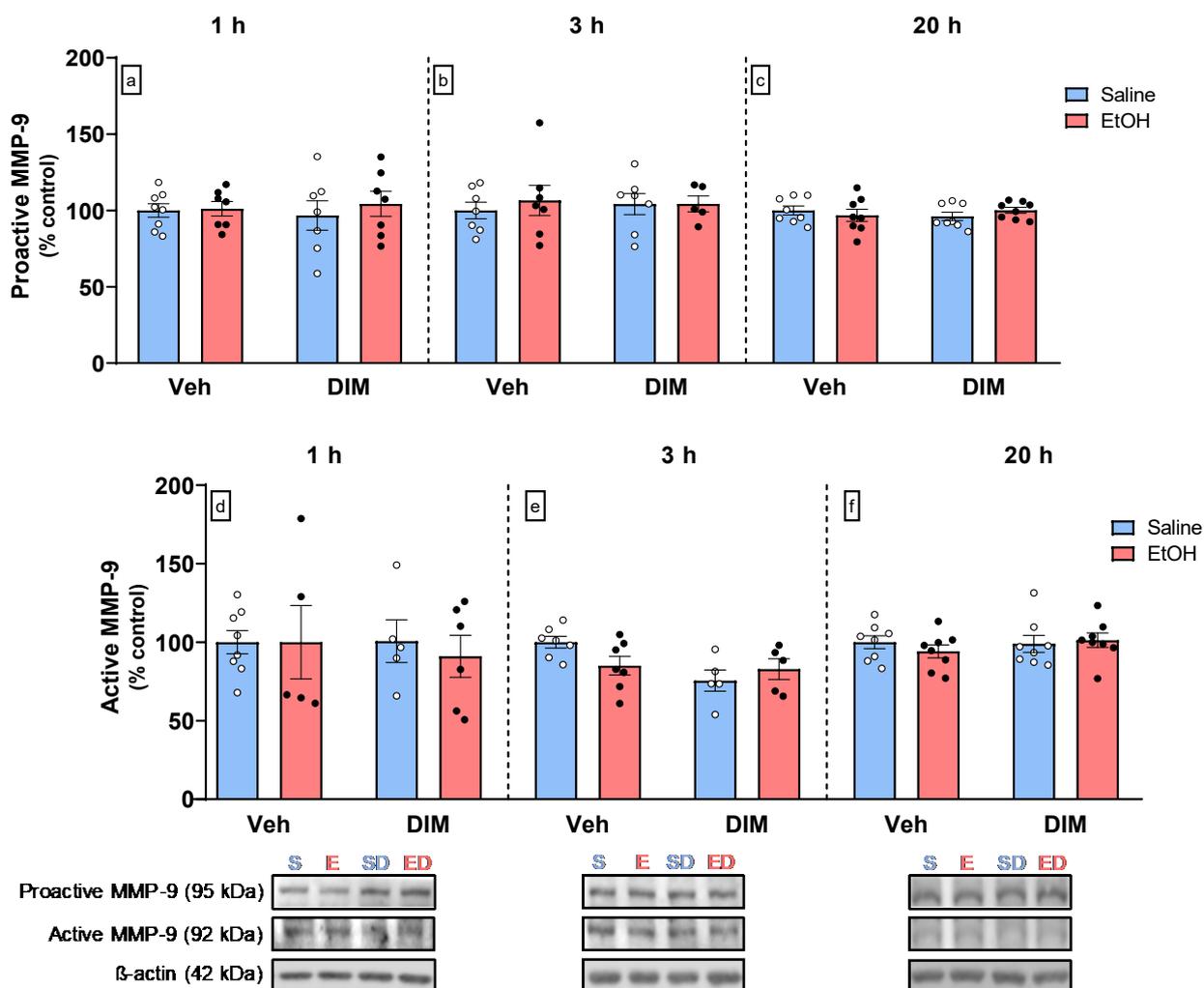


**Figura 26.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la actividad de MMP-9 en el hipocampo. Se muestran los niveles de actividad de MMP-9 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{$$$}p < 0.001$  y  $^{$$$$}p < 0.0001$  vs. Saline; efecto principal de DIM  $^{\lambda}p < 0.05$  vs. Vehicle; seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $^{\#}p < 0.01$  vs. EtOH + Vehicle

### 3.2.2. Efecto del tratamiento con DIM sobre la expresión de MMP-9

En vista a los resultados obtenidos en la zimografía para la actividad de MMP-9, se decidió analizar la concentración de esta enzima por *western blot*, para comprobar si los cambios en su actividad eran debidos a modificaciones en los niveles de expresión de la propia proteína.

A las horas analizadas, la interacción de EtOH y DIM no indujo ninguna alteración en la expresión total de las formas proactiva (Fig. 27a-c) y activa (Fig. 27d-f) de MMP-9, ni tampoco se observaron cambios debidos a los efectos principales de la exposición a EtOH o el tratamiento con DIM.



**Figura 27.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión de MMP-9 en el hipocampo. Se muestra la expresión de la forma proactiva (a-c) y activa (d-f) de MMP-9 (a, d) 1 h, (b, e) 3 h y (c, f) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se expresan como la media ± EEM (n = 5-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías.

#### 4. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la neurogénesis y la supervivencia de células de nueva generación

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, se analizó el impacto del protocolo de administración de EtOH tipo *binge* sobre la supervivencia de células de nueva generación 20 h después del último tratamiento con EtOH, mediante la colocación de marcadores de linaje celular junto con BrdU. En el caso de neuronas se usó como marcador NeuN; para microglía,

Iba-1; y para astrocitos, GFAP. Por otro lado, también se estudió la supervivencia de neuronas inmaduras mediante el marcador DCX a 1 y 20 h tras el último *binge*.

#### 4.1. ESTUDIO DE COLOCALIZACIÓN DE BRDU CON MARCADORES DE LINAJE CELULAR

Para el estudio de supervivencia neuronal, a 20 h post-*binge*, el análisis estadístico reveló que la interacción de EtOH y DIM no produjo ningún efecto sobre el número de células doblemente positivas (BrdU<sup>+</sup> / NeuN<sup>+</sup>). En cuanto a los efectos principales, los resultados mostraron alteraciones debidas al efecto principal de la exposición a EtOH ( $F_{1,20} = 6.546$ ,  $p = 0.019$ ). Se observó una disminución significativa de la tinción NeuN<sup>+</sup> / BrdU<sup>+</sup> en los animales expuestos al *binge* de EtOH. Los animales tratados con DIM no mostraron cambios en los niveles de estos marcadores (Fig. 28a).

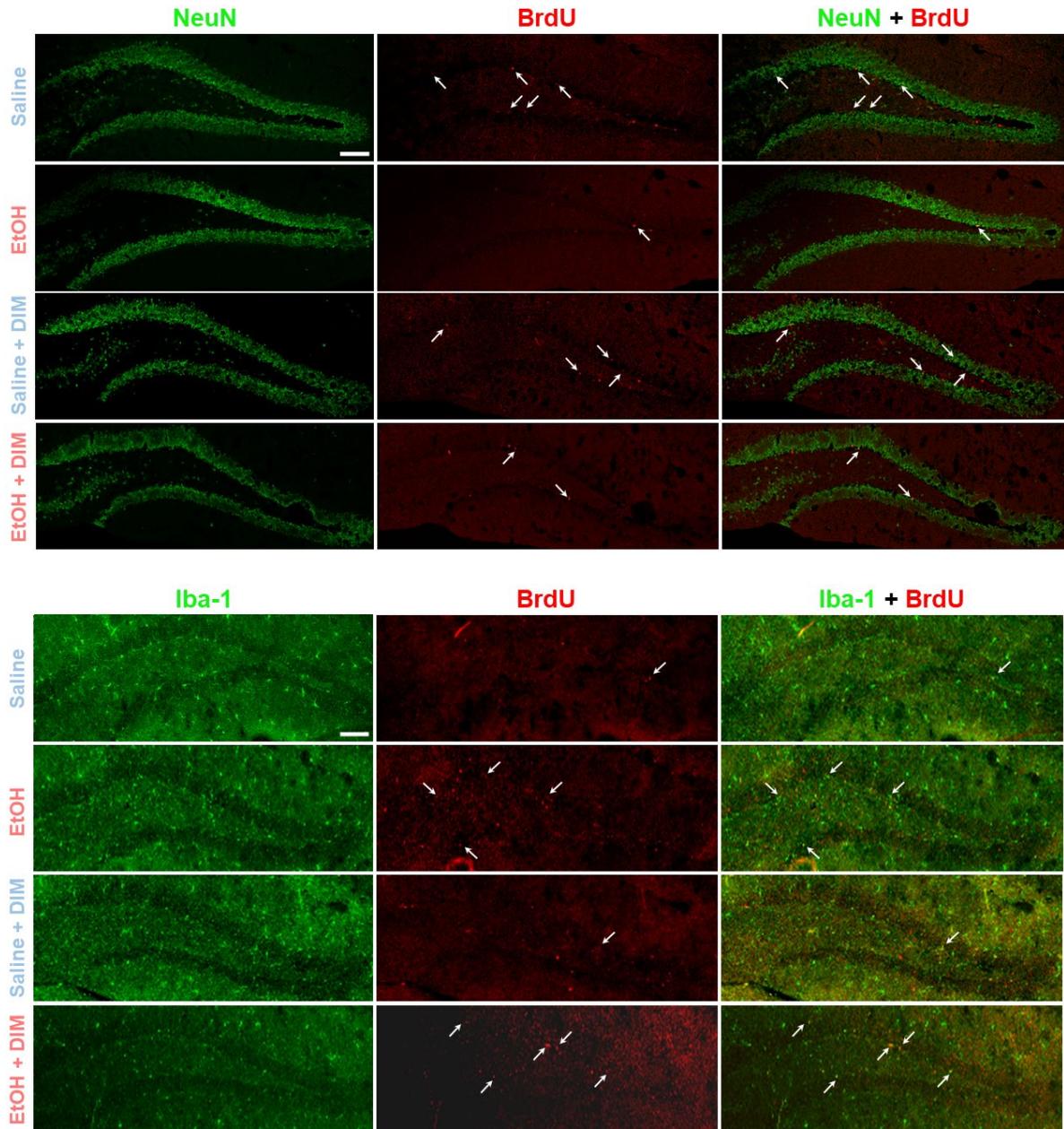
En cuanto a la supervivencia microglial, el ANOVA de dos vías de nuevo descartó un efecto de la interacción de EtOH y DIM. Por otro lado, desveló un cambio en la tinción de Iba-1<sup>+</sup> / BrdU<sup>+</sup> por el efecto principal de la exposición a EtOH ( $F_{1,21} = 40.89$ ,  $p < 0.0001$ ), observándose una acusada elevación de estos marcadores con respecto a los animales que recibieron salino. Por último, no hubo cambios debidos al efecto principal del tratamiento con DIM (Fig. 28b).

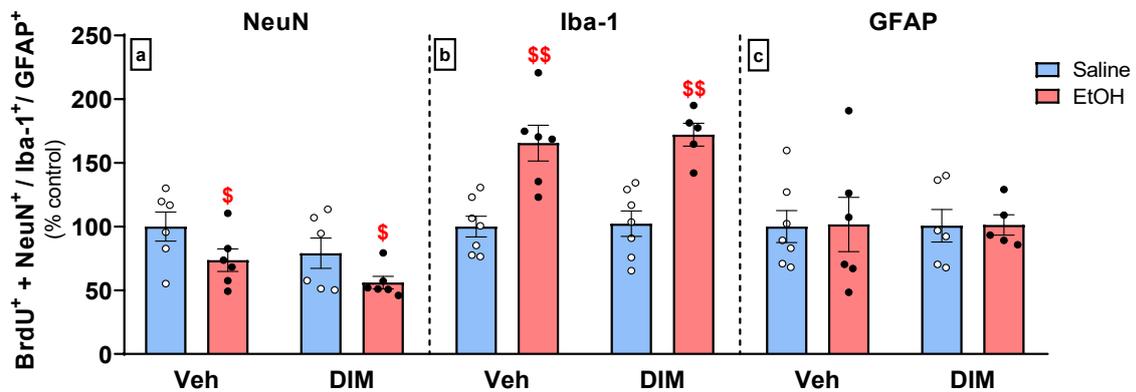
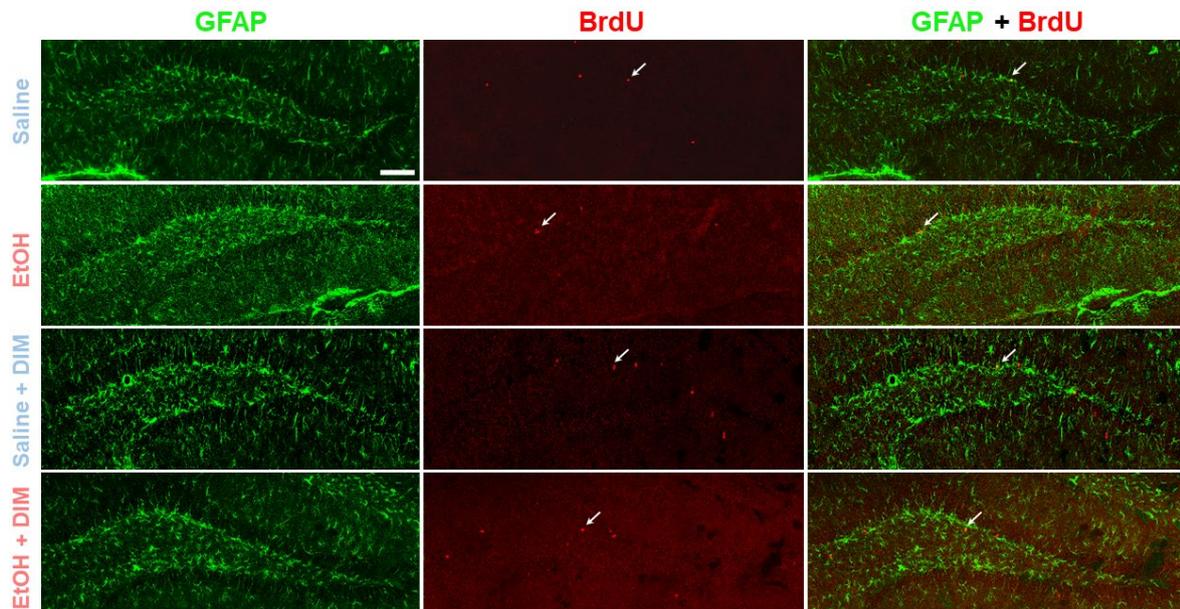
Finalmente, de acuerdo con el análisis estadístico, no se produjo ningún efecto significativo sobre la supervivencia astrocítica, estudiada como coexpresión de GFAP<sup>+</sup> / BrdU<sup>+</sup>, por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 28c).

#### 4.2. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE NEURONAS INMADURAS

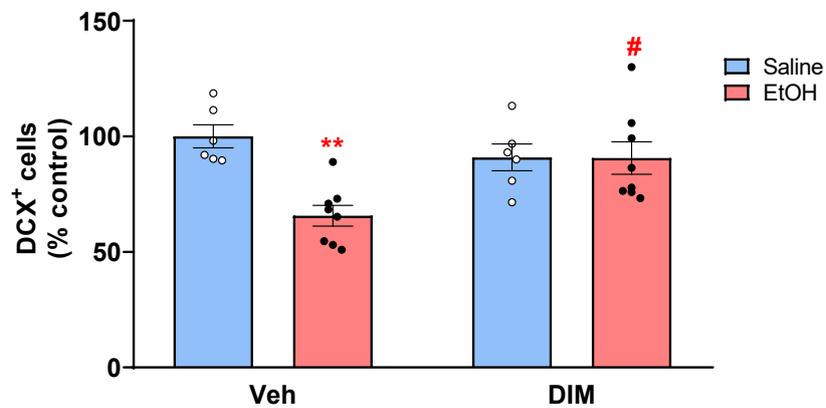
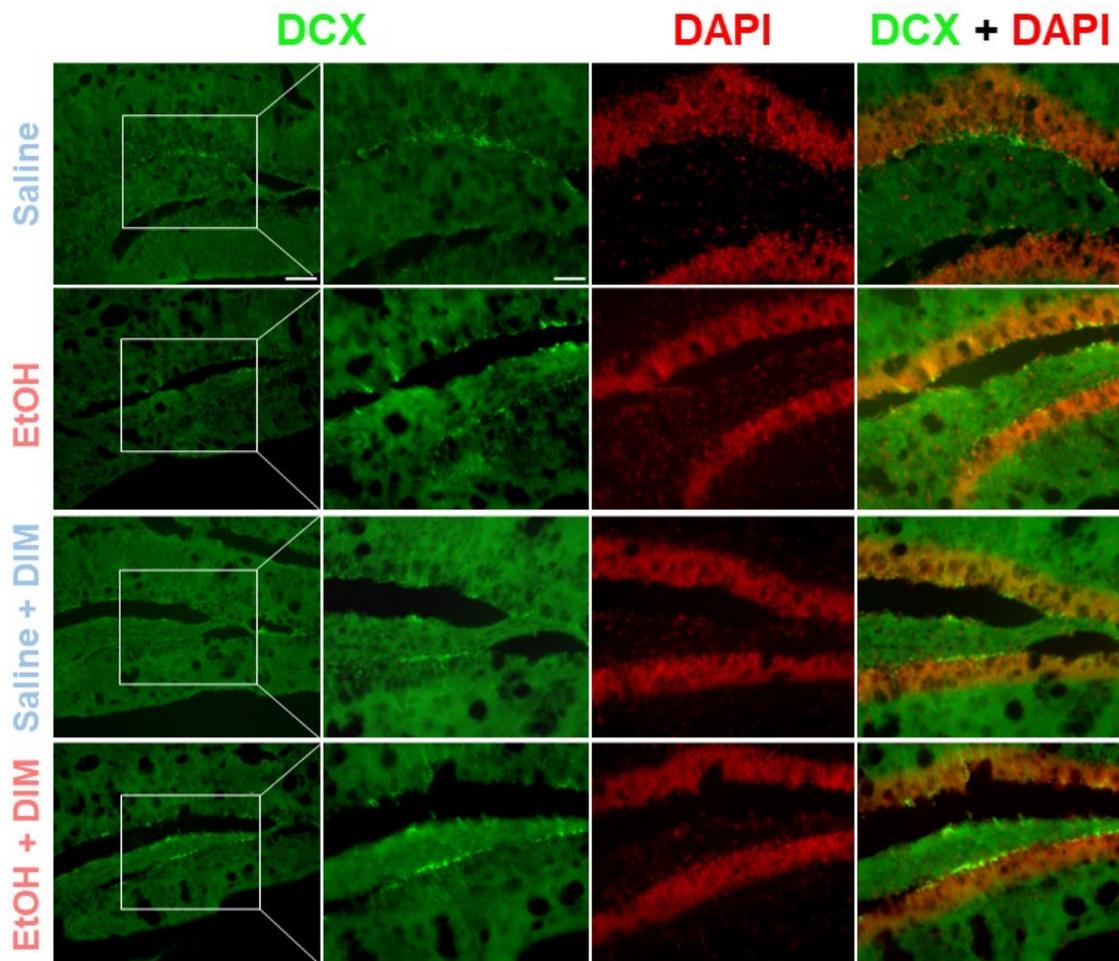
Para el estudio de supervivencia de neuronas inmaduras DCX-positivas, que comenzaron a dividirse una vez comenzado el protocolo *binge*, a 20 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo en la proporción de células que expresaban DCX por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,24} = 8.464$ ,  $p = 0.008$ ). El test *post-hoc* de Tukey manifestó una disminución significativa de la expresión de DCX en los animales que recibieron dosis de EtOH ( $p = 0.002$ ), mientras que el cotratamiento con DIM prevenía este efecto frente a los animales que recibieron el vehículo ( $p = 0.026$ ) (Fig. 29).

# RESULTADOS





**Figura 28.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre eventos proliferativos en el hipocampo. Se muestra la proporción de células maduras positivas para el comarcaje de (a) BrdU<sup>+</sup> + NeuN<sup>+</sup>, (b) BrdU<sup>+</sup> + Iba-1<sup>+</sup> y (c) BrdU<sup>+</sup> + GFAP<sup>+</sup> 20 h tras la última administración de EtOH y 28 días tras la administración de BrdU. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-7). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH <sup>\$</sup>p<0.05 y <sup>\$\$</sup>p<0.01 vs. Saline. Escala = 100 μm.



**Figura 29.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la supervivencia de neuronas de **inmaduras**. Se muestra la proporción de células DCX<sup>+</sup> a 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM (n = 7-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción: \*\* $p < 0.01$  vs. Saline + Vehicle y # $p < 0.05$  vs. EtOH + Vehicle. Escalas: 10X = 100  $\mu$ m; 20X = 50  $\mu$ m.

## 5. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la expresión de mediadores implicados en la ruta de señalización de BDNF

BDNF es una neurotrofina clave en los procesos de plasticidad implicados en aprendizaje y memoria, así como en eventos de neurogénesis. Por ello, tras los resultados obtenidos por inmunohistoquímica sobre la supervivencia de células de nueva generación, se propuso analizar por *western blot* la expresión de factores mediadores en la señalización por BDNF, como son el propio BDNF y las formas fosforiladas del receptor TrkB, la kinasa Akt y el factor de transcripción CREB, de nuevo en un curso temporal de 1, 3 y 20 h.

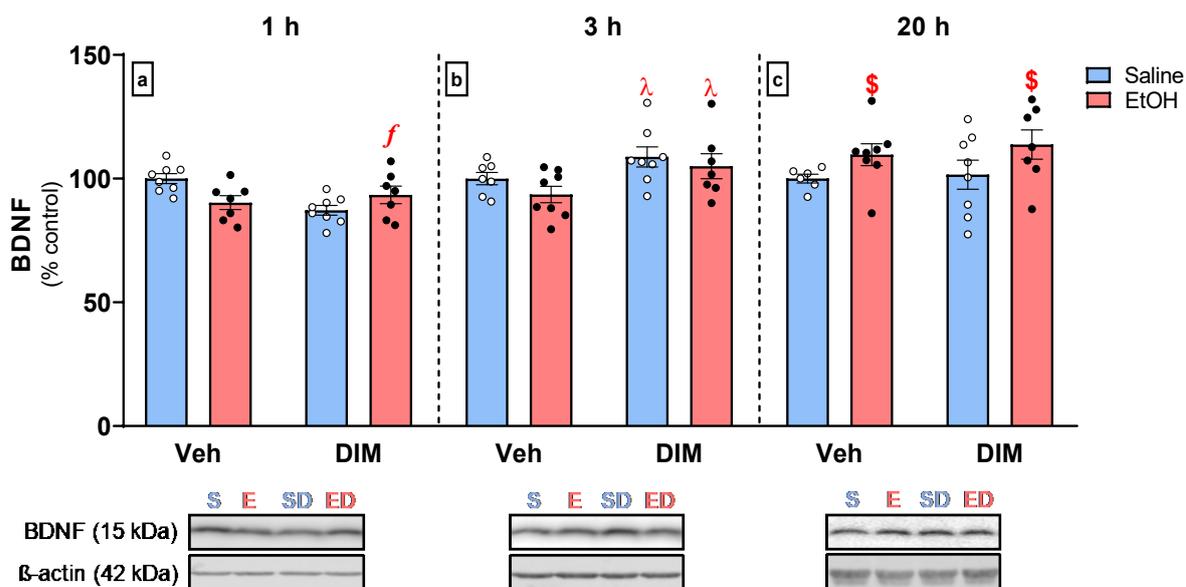
### 5.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE BDNF

A 1 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró una alteración en la expresión total de BDNF por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,26} = 9.501$ ,  $p = 0.005$ ). Sin embargo, el test *post-hoc* de Tukey no reveló diferencias significativas (Fig. 30a).

A 3 h post-*binge*, el protocolo *binge* no provocó un efecto significativo en la expresión total de BDNF por la interacción de EtOH y DIM. En cuanto a los efectos principales, no se observó ninguna alteración debida a la exposición a EtOH, pero sí un incremento de BDNF por el tratamiento con DIM ( $F_{1,26} = 6.953$ ,  $p = 0.014$ ) (Fig. 30b).

Finalmente, a 20 h post-*binge*, el análisis estadístico mostró que el protocolo *binge* no provocó ningún cambio en la expresión total de BDNF por la interacción de EtOH y DIM. En cuanto a los efectos principales, no se observó ninguna alteración debida al tratamiento con DIM, pero sí un aumento de los niveles de BDNF por la exposición a EtOH ( $F_{1,25} = 4.646$ ,  $p = 0.041$ ) (Fig. 30c).

## RESULTADOS



**Figura 30.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión de BDNF en el hipocampo. Se muestra la expresión de BDNF (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{\$}p < 0.05$  vs. Saline; efecto principal de DIM  $^{\lambda}p < 0.05$  vs. Vehicle; efecto de la interacción  $^f p < 0.05$ ; seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción.

### 5.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TRKB

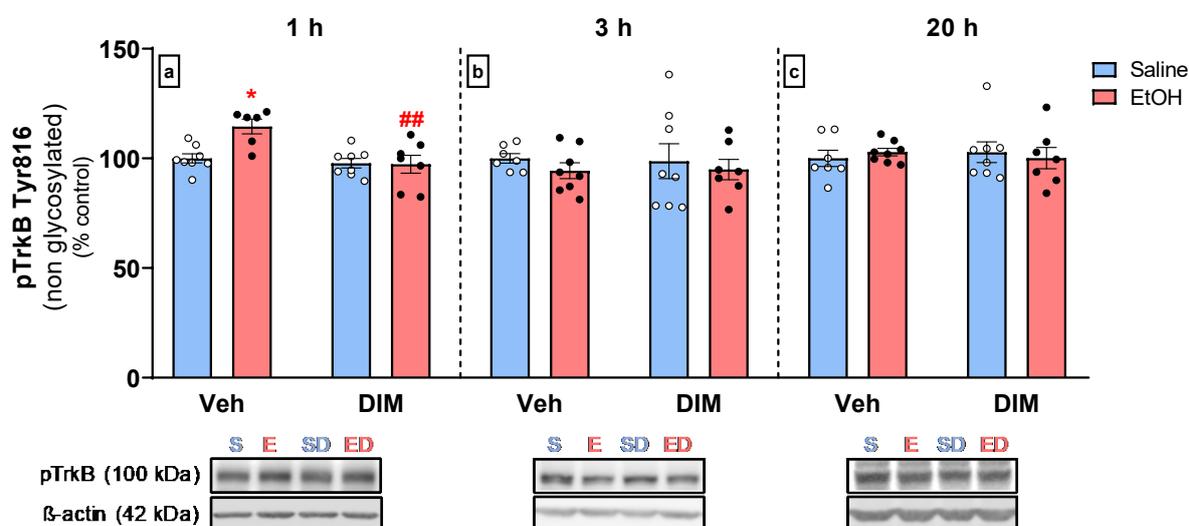
El receptor TrkB es el receptor a través del cual señaliza BDNF. Al ser un receptor con actividad tirosina-kinasa, posee la capacidad de autofosforilarse para iniciar las cascadas de señalización asociadas tras la unión de las neurotrofinas. La fosforilación del residuo Tyr816 activa la vía de la fosfolipasa  $C\gamma$ , que se relaciona con plasticidad sináptica y neurotransmisión. A su vez, TrkB sufre un proceso de glicosilación postranscripcional que genera la forma madura del receptor. La glicosilación de TrkB parece estar relacionada con la regulación de la incorporación del receptor a la membrana sináptica. Por todo ello, el estudio del receptor TrkB se llevó a cabo estudiando la forma fosforilada en su residuo Tyr816, tanto en la forma inmadura como en la glicosilada.

#### 5.2.1. Forma no glicosilada

A 1 h *post-binge*, el ANOVA de dos vías mostró que el protocolo *binge* provocó un efecto significativo en la expresión total de la forma no glicosilada del receptor TrkB con fosforilación

en el residuo tirosina 816 (pTrkB Tyr816) por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,25} = 6.583$ ,  $p = 0.017$ ). El test *post-hoc* de Tukey mostró un aumento significativo de la expresión de pTrkB Tyr816 en los animales sometidos al *binge* de EtOH frente a los animales control ( $p = 0.010$ ), mientras que el tratamiento con DIM tras la exposición a EtOH previno dicho aumento ( $p = 0.003$ ) (Fig. 31a).

A 3 y 20 h post-*binge*, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la forma no glicosilada del receptor pTrkB Tyr816 ni por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales del EtOH ni de DIM (Fig. 31b, c).



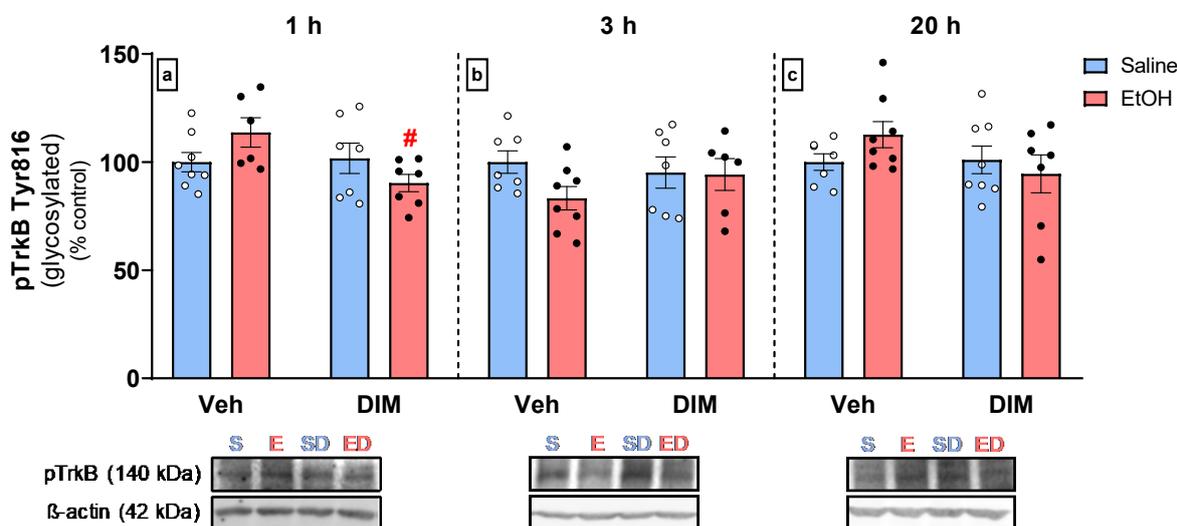
**Figura 31.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la forma inmadura del receptor TrkB fosforilado en el residuo tirosina 816 en el hipocampo. Se muestra la expresión de la forma no procesada del receptor pTrkB Tyr816 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 6-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción: \* $p < 0.05$  vs. Saline + Vehicle y \*\* $p < 0.01$  vs. EtOH + Vehicle.

### 5.2.2. Forma glicosilada

A 1 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías mostró que el protocolo *binge* provocó un efecto significativo en la expresión total de la forma glicosilada del receptor pTrkB Tyr816 por la interacción de EtOH y DIM ( $F_{1,25} = 4.994$ ,  $p = 0.035$ ). El test *post-hoc* de Tukey mostró un descenso significativo de la expresión de pTrkB Tyr816 glicosilado en los animales sometidos al *binge* de EtOH cotratados con DIM frente a los que recibieron dosis del vehículo ( $p = 0.042$ ) (Fig. 32a).

## RESULTADOS

A 3 y 20 h post-*binge*, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de pTrkB Tyr816 glicosilada por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco como consecuencia del efecto principal de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 32b, c).

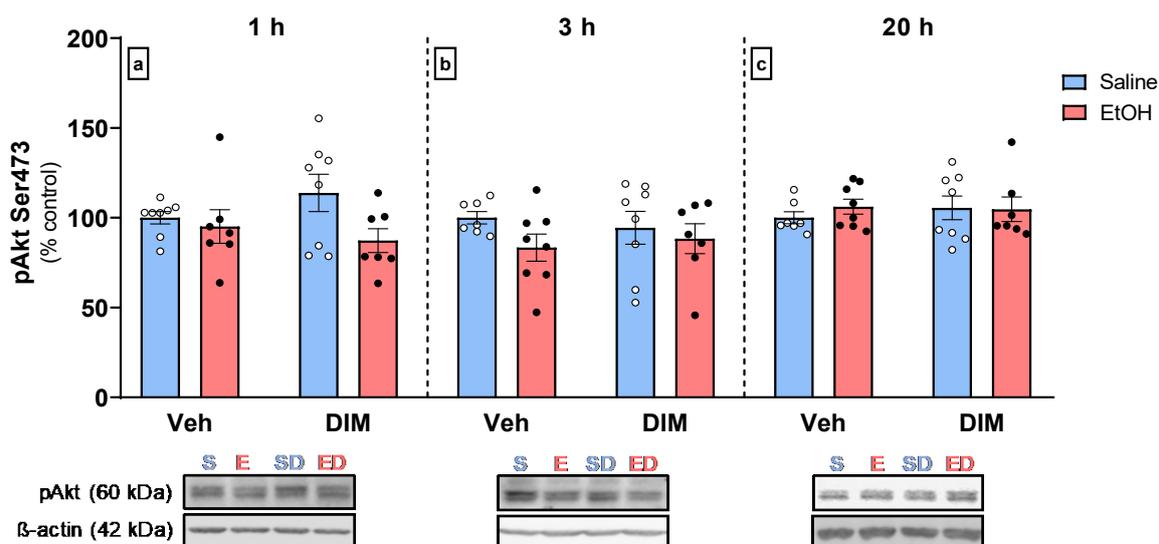


**Figura 32.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la forma madura del receptor TrkB fosforilado en el residuo tirosina 816 en el hipocampo. Se muestra la expresión de la forma glicosilada del receptor pTrkB Tyr816 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 6-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías, seguido del *post-hoc* de Tukey cuando hubo efecto de la interacción:  $^{\#}p < 0.05$  vs. EtOH + Vehicle.

### 5.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE AKT

A 1 h post-*binge*, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de la forma fosforilada en el residuo serina 473 de Akt (pAkt Ser473) por la interacción de EtOH y DIM. En cuanto a los efectos principales, no se produjeron alteraciones como consecuencia del tratamiento con DIM, mientras que la exposición a EtOH sí mostraba una tendencia a disminuir la expresión de pAkt Ser473 ( $F_{1,26} = 3.928$ ,  $p = 0.058$ ) (Fig. 33a).

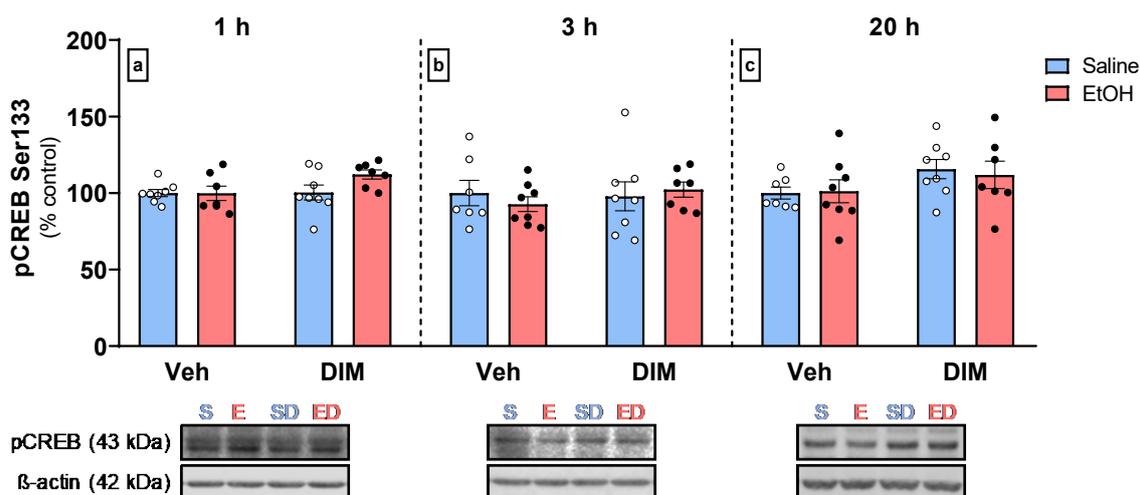
A 3 y 20 h post-*binge*, el ANOVA de dos vías no evidenció ninguna alteración en la expresión total de pAkt Ser473 por la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de EtOH ni DIM (Fig. 33b, c).



**Figura 33.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la kinasa Akt fosforilada en el residuo serina 473 en el hipocampo. Se muestra la expresión pAkt Ser473 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 7-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías.

#### 5.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DIM SOBRE LA EXPRESIÓN DE CREB

La forma fosforilada en el residuo serina 133 del factor de transcripción CREB (pCREB Ser133) no sufrió ninguna alteración en sus niveles totales de expresión por el efecto de la interacción de EtOH y DIM, ni como consecuencia del efecto principal del EtOH ni del tratamiento con DIM, en ninguno de los puntos temporales analizados (Fig. 34).



**Figura 34.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre el factor de transcripción CREB fosforilado en el residuo serina 133 en el hipocampo. Se muestra la expresión pCREB Ser133 (a) 1 h, (b) 3 h y (c) 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 7-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías.

### **6. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la expresión de proteínas implicadas en la dinámica fusión-fisión mitocondrial**

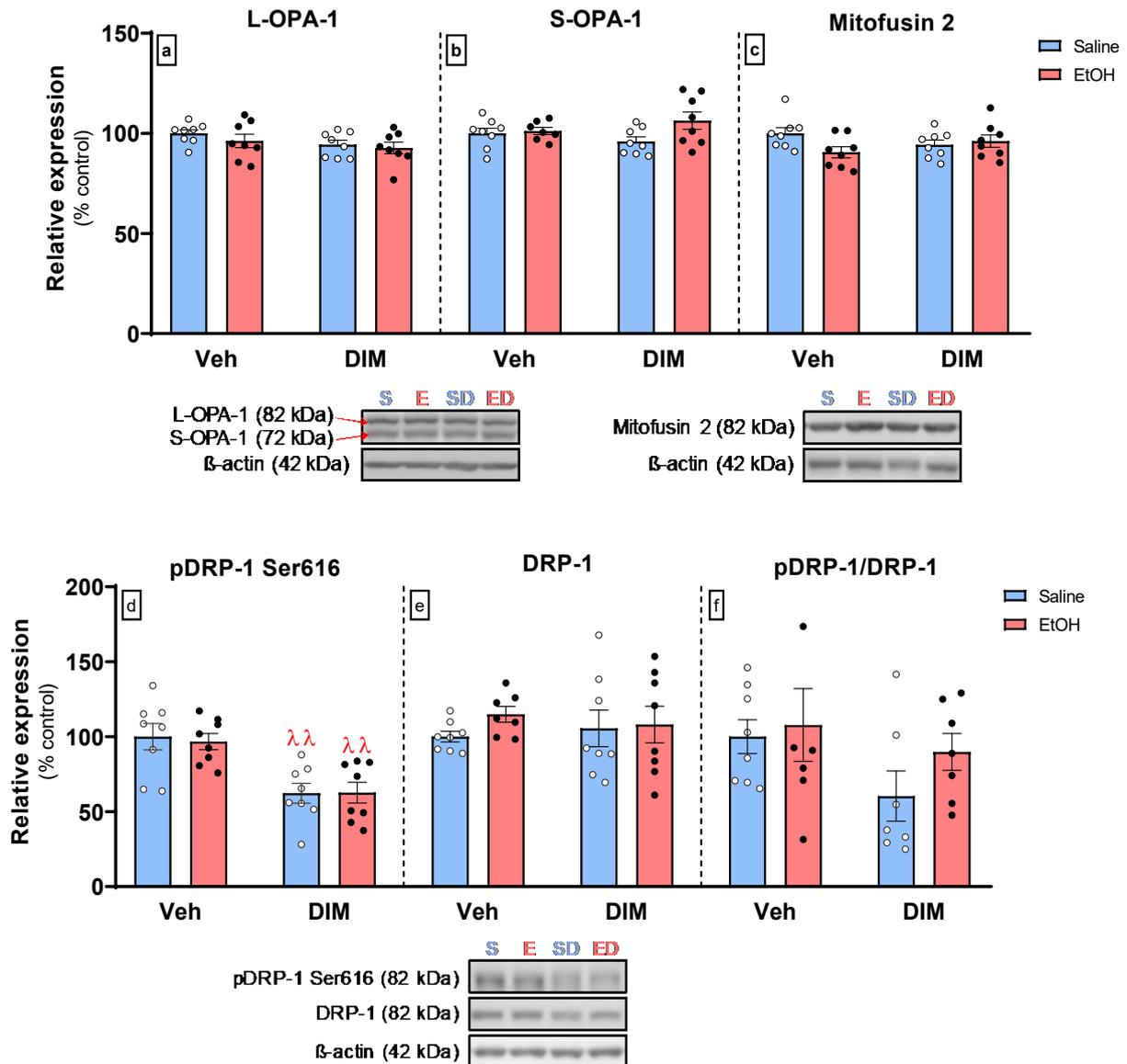
Los eventos de fusión y fisión mitocondrial suponen un mecanismo clave para la regulación energética de la célula y, por tanto, un factor indispensable para la supervivencia celular. Dado que el consumo de EtOH puede alterar estas dinámicas, se procedió a analizar una serie de proteínas implicadas en esta función a las 20 h tras la última exposición a EtOH: OPA-1 (formas larga y corta, L-OPA-1 y S-OPA-1, respectivamente), mitofusina 2, DRP-1 y su forma fosforilada en el residuo serina 616 (pDRP-1 Ser616).

A excepción de pDRP-1 Ser616, el análisis estadístico reveló que ninguna de las proteínas estudiadas sufrió alteraciones debidas a la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni a DIM (Fig. 35a, b, c, e, f). En el caso de pDRP-1 Ser616, el ANOVA de dos vías manifestó una alteración en su concentración como efecto principal del tratamiento con DIM ( $F_{1,28} = 25.8, p < 0.0001$ ), no así por la exposición a EtOH ni por la interacción de ambos factores. Los resultados mostraron que los animales que recibieron DIM sufrieron una acusada reducción de la forma fosforilada de dicha proteína (Fig. 35d).

### **7. Efecto del tratamiento con DIM sobre las alteraciones inducidas por el *binge* de etanol en la expresión de proteínas de defensa antioxidante**

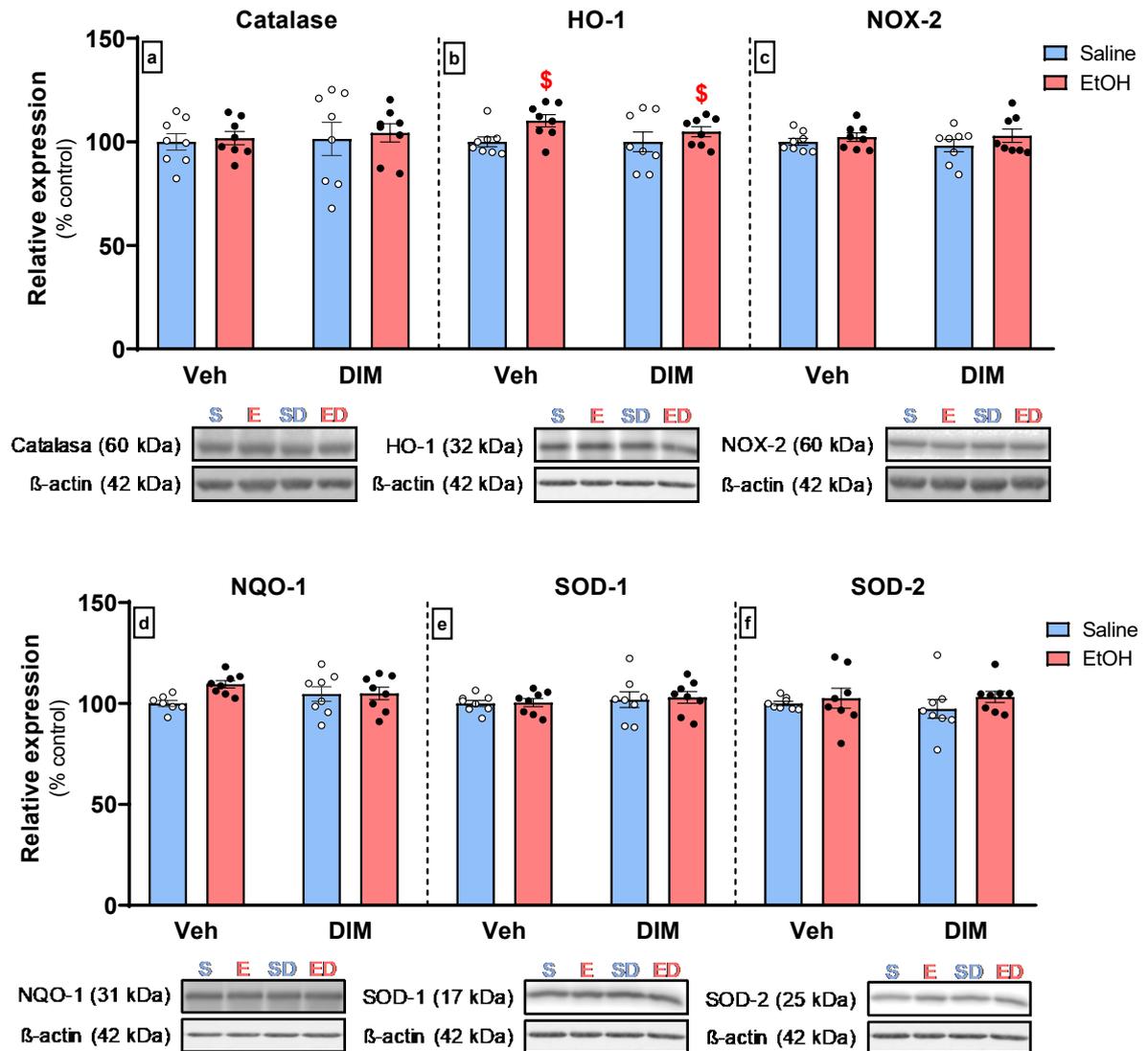
A continuación, se evaluó el estado de expresión de una serie de proteínas encargadas de la eliminación de radicales libres: catalasa, NOX-2, hemooxigenasa-1 (HO-1), NQO-1, superóxido dismutasa-1 y 2 (SOD-1 y SOD-2, respectivamente).

A excepción de HO-1, el análisis estadístico demostró que, a 20 h post-*binge*, ninguna de las proteínas estudiadas sufrió alteraciones en su expresión total debido a la interacción de EtOH y DIM, ni tampoco por los efectos principales de la exposición a EtOH ni del tratamiento con DIM (Fig. 36a, c, d, e, f). En el caso de HO-1, el ANOVA de dos vías manifestó una alteración en su concentración como efecto principal de la exposición a EtOH ( $F_{1,28} = 5.348, p = 0.028$ ), produciéndose un leve aumento de la expresión de HO-1 (Fig. 36b).

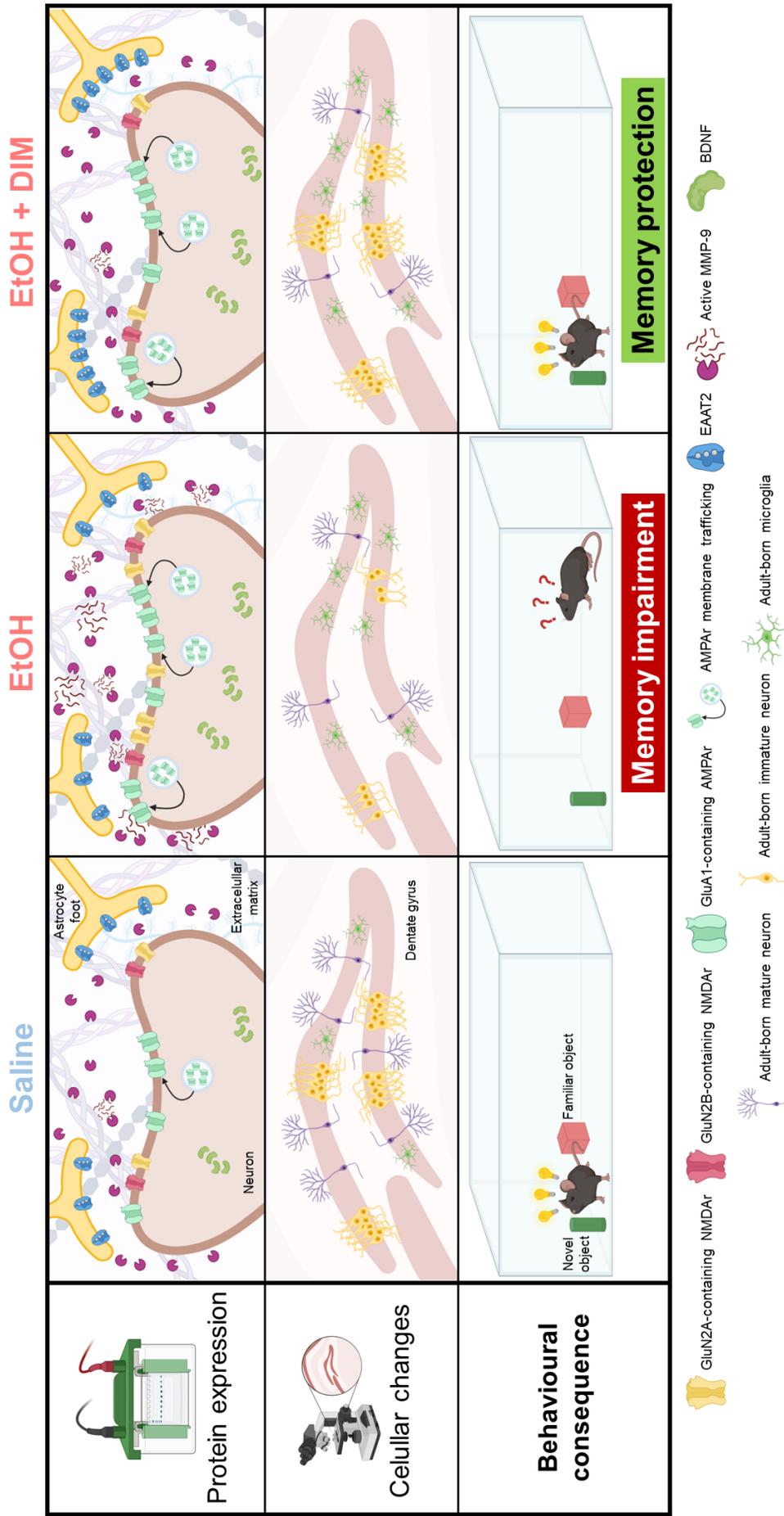


**Figura 35.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión proteínas implicadas en los eventos de fusión-fisión mitocondrial en el hipocampo. Se muestra la expresión de (a) L-OPA-1, (b) S-OPA-1, (c) Mitofusina 2, (d) forma fosforilada de DRP1 en el residuo serina 616, (e) DRP-1 total y (f) la relación pDRP-1 Ser616/DRP-1 total, todas a 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 7-8). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal de DIM  $\lambda\lambda p < 0.01$  vs. Vehicle.

## RESULTADOS



**Figura 36.** Efecto del *binge* de EtOH y del tratamiento con DIM sobre la expresión proteínas implicadas en los eventos de fusión-fisión mitocondrial en el hipocampo. Se muestra la expresión de (a) catalasa, (b) hemoxygenasa 1, (c) NOX-2, (d) NQO-1, (e) superóxido dismutasa 1 y (f) superóxido dismutasa 2, todas 20 h tras la última administración de EtOH. Los datos se expresan como porcentaje vs. control y los resultados se muestran como la media  $\pm$  EEM ( $n = 7-8$ ). El análisis estadístico se realizó empleando un ANOVA de dos vías: efecto principal del EtOH  $^{\$}p < 0.05$  vs. Saline.



**Figura 37. Resumen gráfico de los principales resultados presentados.** En el hipocampo, la exposición intensiva a EtOH produce un incremento de la expresión de la subunidad GluN2A del receptor NMDA y aumenta la inserción en la membrana neuronal del receptor AMPA. Además, promueve la activación de MMP-9 y aumenta ligeramente los niveles de BDNF. A nivel celular, el *binge* de EtOH disminuye el número de neuronas inmaduras y el de neuronas maduras de nueva generación en el giro dentado. Estas alteraciones se traducen en un déficit de memoria de reconocimiento de objeto. Por su parte, el tratamiento con DIM protege la función de memoria mediante la prevención del desequilibrio en las subunidades del receptor NMDA, el aumento de la expresión del transportador astrocítico de glutamato EAAT2 y la disminución de la actividad de MMP-9. Imagen creada en Biorender.com.



---

# Discusión

---



## DISCUSIÓN

El alcohol, o EtOH, según la nomenclatura química, es la droga de abuso más consumida en el mundo, principalmente por su estatus legal y por la aceptación social de la que goza en una inmensa mayoría de países. El impacto que genera, no solo al individuo que lo consume, sino al conjunto de la sociedad, hace que sea una de las grandes preocupaciones en materia de salud pública mundial. Si bien los patrones de uso crónico y los casos de dependencia a EtOH se dan más frecuentemente en etapas más avanzadas de la vida, el consumo tipo *binge*, o en atracón, es el más practicado por los adultos jóvenes, así como entre adolescentes. Este grupo de población joven es especialmente vulnerable a la exposición a niveles tóxicos de alcohol, ya que se trata de un periodo de desarrollo en el que se producen importantes cambios plásticos, habiéndose demostrado, entre otras, graves consecuencias estructurales y cognitivas, que pueden seguir patentes en la adultez y senectud. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a paliar los efectos de este patrón de consumo tipo *binge* sobre los procesos de aprendizaje y memoria cobra especial relevancia de cara a amortiguar su impacto en la salud pública.

En los últimos años, el 3,3'-diindolilmetano, o DIM, producto de la digestión del indol-3-carbinol presente de forma natural en los vegetales de la familia de las brassicáceas, ha sido objeto de numerosos estudios por sus propiedades terapéuticas anticancerígenas y antioxidantes. Más recientemente, este interés se ha visto incrementado por su potencial como protector neurológico, incluso a nivel cognitivo. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se ha evaluado el efecto de DIM sobre las alteraciones cognitivas y los posibles mecanismos subyacentes producidos por la exposición a un modelo de *binge* de EtOH. Nuestros datos demuestran que DIM protege de la disfunción de la memoria de reconocimiento provocada por el EtOH. Cuando exploramos posibles mecanismos involucrados en este déficit cognitivo, observamos que DIM modula la neurotransmisión glutamatérgica, ya que mantiene la homeostasis entre las subunidades del receptor glutamatérgico NMDA y modifica la expresión del transportador de glutamato EAAT2. Así mismo, regula la actividad proteolítica de MMP-9 y previene el descenso de neurogénesis inducido por el EtOH mediante un proceso independiente de BDNF. Teniendo en cuenta estos resultados, DIM se postula como una posible herramienta terapéutica en la prevención del daño cognitivo provocado por el *binge* de EtOH.

## DISCUSIÓN

- Nuestro primer estudio tenía como objetivo analizar los posibles efectos del tratamiento con DIM sobre el impacto del *binge* de EtOH en la función de memoria de reconocimiento.

Demostramos que el tratamiento con DIM previene el déficit de memoria de reconocimiento inducido por el *binge* de EtOH, según los resultados del test NOR realizado a las 20 h tras la última administración de EtOH. Los ratones expuestos a EtOH sufrieron una disminución del índice de discriminación con respecto a los animales control, mientras que los tratados con DIM mantenían un índice similar al de los controles. Sin embargo, a los 7 días, el déficit de memoria inducido por el EtOH seguía presente, sin observarse la prevención por DIM. Para descartar que la acción de DIM a 20 h se produjera por una aceleración de la eliminación plasmática del EtOH, comparamos los niveles de EtOH plasmáticos entre animales tratados con DIM y no tratados. Confirmamos que la eliminación en sangre era igual en ambos casos y, por tanto, descartamos un posible efecto de DIM sobre la biotransformación del EtOH, siendo esta la principal vía de eliminación de la sustancia.

Son numerosos los estudios que muestran las consecuencias perjudiciales que el consumo de EtOH tiene sobre la función cognitiva de memoria. A este respecto, nuestros datos concuerdan con estudios en modelos animales que han evidenciado un menor rendimiento en pruebas de memoria de reconocimiento, tanto en consumo tipo *binge*<sup>107,202,203</sup> como consumo crónico<sup>108</sup>. Igualmente, otros tipos de memoria, como la memoria espacial<sup>204-206</sup> o la memoria aversiva<sup>207,208</sup> también se ven afectadas por la exposición a EtOH en múltiples patrones de ingesta. Se han observado resultados similares en estudios en humanos, donde se han ratificado los efectos deletéreos del EtOH sobre diversas funciones cognitivas, en distintos grupos de edad<sup>209-211</sup>. Además, en nuestro estudio, el déficit de memoria inducido por el *binge* de EtOH se mantiene, al menos, durante 7 días, lo que evidencia los efectos a largo plazo que ejerce la exposición a EtOH sobre el sistema nervioso. Se ha descrito en modelos animales que el consumo de EtOH en etapas tempranas de la vida puede desencadenar modificaciones en el cerebro adulto<sup>212</sup>, que se pueden ver reflejadas, por ejemplo, en variaciones estructurales<sup>213</sup>, alteraciones en los sistemas de neurotransmisión<sup>203,214,215</sup> o cambios en la conducta<sup>216</sup>. Igualmente, hay estudios longitudinales en humanos que coinciden con los datos preclínicos, ya que se ha corroborado la pérdida de materia gris o la reducción de materia blanca en adolescentes y jóvenes adultos tras la práctica de *binge drinking*<sup>209,217,218</sup>.

En cuanto a los efectos de DIM, hasta la fecha, solo hay un estudio que ha constatado específicamente el efecto protector de DIM sobre la memoria. En ratones, el tratamiento con

una dosis diaria de DIM vía oral durante tres días previno el déficit de memoria espacial, medido con la prueba del laberinto de agua de Morris, inducido por la administración de escopolamina (antagonista no específico de receptores muscarínicos usado para simular déficits de memoria por su capacidad para interrumpir la señalización colinérgica)<sup>195</sup>. El paralelismo de nuestro experimento con este estudio en cuanto a administración repetida de DIM y aplicación de un estímulo nocivo para la cognición respalda nuestro resultado como nueva evidencia de que el tratamiento con DIM es eficaz contra el déficit de memoria; concretamente, en nuestro caso, la memoria de reconocimiento.

En nuestros experimentos, el efecto de DIM se evaluó en torno a dos factores: el número de dosis recibidas y el momento de administración. En primer lugar, el tratamiento con una única dosis de DIM, administrada el último día de *binge*, en lugar de cuatro dosis, no consiguió prevenir el déficit de memoria registrado en la prueba NOR a 20 h. En vista de nuestros resultados, cabría pensar que la administración de una sola dosis del compuesto no es suficiente para inducir los mecanismos de neuroprotección ante la toxicidad del EtOH, sino que, por el contrario, fuera necesaria una administración repetida para poder desencadenar las respuestas neuroprotectoras. Asimismo, en el estudio anteriormente mencionado de déficit conductual por administración de escopolamina<sup>195</sup>, la prevención de la disfunción de memoria espacial se obtuvo después de tres días de tratamiento con DIM. Aunque no probaron con un menor número de dosis, este trabajo respalda que la administración repetida de DIM ejerce eficazmente efectos neuroprotectores sobre la memoria frente al daño producido por EtOH.

Por el contrario, al realizar el test NOR a los 7 días tras la finalización del protocolo *binge*, no se observó el efecto protector de DIM, tanto si este se administra durante el periodo de exposición a EtOH como durante los cuatro días previos a la realización del test NOR, es decir, tres días tras la última administración de EtOH (ver Materiales y métodos, sección 3.2., Figura 8c, d). Este dato indica que nuestro protocolo de administración de DIM actúa de forma eficaz sobre el déficit de memoria tan solo de forma aguda y si se aplica durante el periodo de exposición a EtOH.

En el último bloque de experimentos de comportamiento se examinó el efecto neuroprotector de DIM sobre la memoria de reconocimiento a 20 h en ratones hembra. El análisis conductual reveló una disminución significativa del índice de discriminación, reflejando, por tanto, un daño en la memoria de reconocimiento, si bien este déficit fue un poco menos marcado que en los machos. Sorprendentemente, el efecto neuroprotector de DIM no

## DISCUSIÓN

resultó estadísticamente significativo, si bien el valor medio del índice de discriminación se aproxima al de los controles. A la luz de estos resultados, decidimos de nuevo analizar la velocidad de aclaramiento del EtOH plasmático, esta vez para comparar si había diferencias metabólicas entre machos y hembras. A las 2 h tras la última dosis de EtOH se podía observar que los niveles de EtOH en la sangre de los ratones hembra eran significativamente menores que en los machos; a las 6 h, los machos tenían una concentración de alcohol en sangre por encima del umbral de la definición de *binge drinking* (>80 mg/dL), mientras que en hembras el EtOH se encontraba por debajo de los límites de detección. Es decir, en ratones hembra, el EtOH se mantiene en el torrente sanguíneo durante menos tiempo que en machos, por lo que tiene menor capacidad temporal para ejercer sus efectos tóxicos en el sistema.

La existencia de diferencias en la respuesta al consumo de EtOH entre ratones macho y hembra está bien documentada. En la literatura se ha descrito que en las cepas C57BL/6J, C57BL/10J, DBA/2J y C3H/He las concentraciones de EtOH en plasma tras la administración intraperitoneal son mayores en machos que en hembras. Por el contrario, distintos estudios indican que la administración de EtOH por vía oral conduce a niveles plasmáticos más elevados en hembras, lo cual pone de manifiesto la existencia de diferencias entre machos y hembras con respecto a las enzimas gástricas y hepáticas encargadas del metabolismo del EtOH<sup>219,220</sup>. Conductualmente, también se ha descrito dimorfismo sexual en los niveles de consumo de EtOH voluntario, siendo las hembras las que muestran mayor predisposición a ingerir la droga<sup>221,222</sup>. Este dato concuerda con lo obtenido desde finales del siglo pasado en la encuesta ESTUDES, llevada a cabo entre adolescentes de nuestro país. En el último informe publicado en el año 2022, la encuesta refleja que, en la población entre 14 y 18 años y desde hace más de 25 años, las chicas muestran mayores cifras de consumo de alcohol tanto en los últimos 12 meses como 30 días, así como una mayor proporción de intoxicaciones etílicas<sup>17</sup>. Sin embargo, cuando las encuestas se realizan en población general (15-64 años), la tendencia se invierte, especialmente a partir de la cuarta década. El último informe del OEDA reveló que la tasa de consumo diario de alcohol es más de 4 veces mayor en hombres que en mujeres (14.2 vs. 3.4 %) y que casi un 70 % de las personas admitidas a tratamiento para la dependencia a EtOH son hombres<sup>5,6</sup>. En cuanto a efectos cognitivos, algunos trabajos han demostrado una mayor vulnerabilidad del sexo femenino a los efectos neurotóxicos del EtOH en la función de memoria, tanto en estudios clínicos<sup>223,224</sup> como preclínicos<sup>225</sup>. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que en nuestro estudio no hemos tenido en cuenta el ciclo estral de las hembras, factor que puede influir en el rendimiento cognitivo según el balance fisiológico

hormonal, creándose así divergencias sexuales en las funciones cognitivas, incluyendo la memoria<sup>226-228</sup>. Por otro lado, se ha sugerido que pueden darse ventajas cognitivas para un sexo u otro según el test conductual realizado y los parámetros de diseño del mismo. Por ejemplo, en el caso de la prueba NOR, estudios con ratas han mostrado mejores resultados en el índice de discriminación en las hembras a medida que se incrementa el intervalo de retención. Por el contrario, en el test de localización de objeto, son los machos los que muestran una mayor capacidad de memoria cuando se aumenta el tiempo de retención<sup>229,230</sup>. Nuestros experimentos se diseñaron con un intervalo de retención muy corto, por lo que la divergencia entre sexos no podría explicarse por este factor. Aunque no podemos descartar por completo que el test conductual elegido genera una ventaja en las hembras, teniendo en cuenta que los controles de ambos sexos muestran niveles similares en el índice de discriminación, podemos suponer que las diferencias observadas entre sexos en esta prueba conductual se deben mayormente a los consecuencias sufridas tras el *binge* de EtOH.

En definitiva, nuestros datos muestran que, el tratamiento con DIM previene, a corto plazo, el déficit de memoria de reconocimiento inducido por el *binge* de EtOH en machos, mostrando una tendencia similar, aunque no significativa, en hembras.

- En el cerebro maduro, el glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia y está implicado en multitud de eventos fisiológicos, como procesos de cognición, aprendizaje y recompensa, y de patologías neurológicas y psiquiátricas.

En el campo de las drogas de abuso, las proyecciones glutamatérgicas de regiones corticales hacia áreas mesolímbicas son clave para el desarrollo de las conductas adictivas<sup>121</sup>. La señalización GABAérgica se consideraba clásicamente como la diana cerebral principal de los efectos del EtOH. A finales de los años 80 surgieron los primeros estudios que desvelaban la capacidad del EtOH para inhibir la función de los receptores NMDA<sup>50</sup>, con lo que estos receptores pasaron a ser uno de los factores mediadores clave para los efectos del EtOH. Por ello, en el siguiente bloque experimental decidimos explorar los efectos de DIM sobre las modificaciones que el *binge* de EtOH pudiera ejercer sobre diferentes componentes del sistema glutamatérgico en el hipocampo.

El primer receptor analizado fue el receptor ionotrópico NMDA, en concreto sus subunidades GluN2A y GluN2B. El *binge* de EtOH indujo un aumento de GluN2A a 1 y 20 h

## DISCUSIÓN

tras la última administración de EtOH, mientras que para GluN2B es a 3 h cuando observamos un leve incremento. Por su parte, DIM previno la modificación de los niveles de GluN2A solo a 1 h tras la última administración a EtOH. Además, dada la especificidad funcional de cada subunidad, resultaba de interés analizar el efecto del EtOH y de DIM sobre las alteraciones en las propiedades cinéticas de los receptores NMDA a través de la ratio GluN2A/GluN2B. Observamos que, a 20 h tras el *binge*, el EtOH producía un marcado incremento en la ratio GluN2A/GluN2B, lo cual se previno por el tratamiento con DIM. Por tanto, el tratamiento con DIM es eficaz en el mantenimiento de la homeostasis entre las subunidades del receptor NMDA.

Como se mencionó en la introducción, los receptores NMDA son heterotetrámeros formados por el ensamblaje de dos heterodímeros, en los que cada uno de ellos contiene obligatoriamente una subunidad GluN1 asociada a otra subunidad NMDA (GluN2A-D, GluN3A-B)<sup>128</sup>. Se sabe que los receptores formados por dímeros GluN1-GluN2A o GluN1-GluN2B son más sensibles a los efectos del EtOH que los que contienen otras subunidades<sup>231</sup>, aunque la sensibilidad de las distintas subunidades puede variar según la región cerebral en cuestión y también según la cepa animal elegida<sup>232,233</sup>. Asimismo, también hay evidencias clínicas de que la alteración de subunidades de NMDA ocurre en pacientes con trastorno por uso de alcohol<sup>234</sup>. En nuestro estudio, además, observamos que los cambios inducidos por el *binge* pueden oscilar según el punto temporal elegido tras la última administración de EtOH, lo que podría estar apuntando a un mecanismo compensatorio entre subunidades. Apoyando la propuesta anterior, en un modelo *knock out* para mGluR5, varias subunidades del receptor NMDA variaban su expresión en el hipocampo y córtex prefrontal en distintas etapas del neurodesarrollo postnatal en respuesta a la ablación de mGluR5<sup>235</sup>.

Dada la implicación esencial de los receptores NMDA en distintos procesos de memoria, podemos postular que la regulación de la expresión de las subunidades de este receptor es uno de los mecanismos de neuroprotección del tratamiento con DIM. Hasta ahora, solo encontramos una publicación que relacione directamente las propiedades neuroprotectoras del tratamiento con DIM con una modulación de los receptores NMDA, en un modelo *in vivo* de asfixia perinatal<sup>44</sup>. Los efectos beneficiosos de DIM ante condiciones de hipoxia se reflejaron en la restauración del peso del hemisferio ipsilateral, la normalización del número de neuronas y la reducción de la expresión de factores apoptóticos. Estos efectos iban acompañados de una disminución de la señalización por las vías de AhR y GluN2B, cuya transcripción se vio

reducida<sup>236</sup>. En cambio, nuestros datos muestran una regulación por parte de DIM específica de la subunidad GluN2A, mientras que carece de efecto para GluN2B. Cabe pensar que la regulación selectiva de estas dos subunidades se deba a la fase vital de los animales: el trabajo con el modelo de hipoxia se desarrolla en la etapa perinatal, momento en el que la expresión de GluN2A comienza a producirse, cuando su presencia todavía es notablemente menor que la de GluN2B; en nuestros experimentos, los ratones son jóvenes adultos, por lo que el cambio de subunidades ya tuvo lugar y la expresión de GluN2B es más reducida. Además, en nuestro caso, es posible que DIM actúe sobre GluN2A porque es la subunidad cuyos niveles de expresión se modifican tras la exposición a EtOH, mientras que no es necesario modular la expresión de GluN2B porque el *binge* de EtOH no genera cambios en ella.

La prevención mediante el tratamiento con DIM del déficit de memoria observado a 20 h tras la última exposición a EtOH se puede correlacionar con la normalización de la ratio GluN2A/GluN2B. Diversos trabajos han abordado la dinámica de las subunidades NMDA en torno a su importancia en eventos de aprendizaje y memoria. Un estudio en ratones que sobreexpresaban la subunidad GluN2A ha demostrado que un aumento en la amígdala basolateral de la ratio GluN2A/GluN2B tras el aprendizaje con un paradigma de memoria de miedo auditiva bloquea la desestabilización y modificación del recuerdo. Adicionalmente, el mismo estudio prueba la importancia de esta ratio en memoria a largo plazo, ya que se observó que aumentar la ratio previo al aprendizaje produjo un deterioro significativo en la memoria de miedo a largo plazo, medida 24 h tras la asociación del estímulo auditivo<sup>237</sup>. También se ha descrito en un paradigma de condicionamiento de miedo con ratones en fase de neurodesarrollo que, al sobreexpresar los niveles de GluN2A en el giro dentado, incrementaba la vulnerabilidad ante la interferencia retrospectiva; esto es, la recuperación de la memoria de miedo ante un estímulo sonoro de baja frecuencia se veía interrumpida tras la presentación de un estímulo novedoso. Es interesante señalar que el mismo resultado se observó cuando se disminuyeron los niveles de GluN2B mediante el uso de RNA de silenciamiento<sup>238</sup>. Un reciente estudio ha encontrado una rara variante génica de GluN2A en un paciente con deficiencia intelectual, epilepsia focal, sordera y retraso en el desarrollo. La mutación que da lugar a esta variante, un cambio del aminoácido lisina por arginina (K879R), no cambia las propiedades cinéticas del receptor, pero aumenta su expresión en la superficie neuronal. Los ensayos con un modelo *knock-in* de la mutación con ratón y con cultivos celulares mostraron que el aumento sináptico de GluN2A o de la forma mutada está ligado a déficits en aprendizaje y memoria, perturbaciones en las corrientes excitadoras mediadas por los receptores NMDA y AMPA y

## DISCUSIÓN

alteraciones en los parámetros de la LTP y LTD<sup>239</sup>. Por tanto, son diversos los estudios que demuestran que una sobreexpresión de la subunidad GluN2A puede generar un impacto negativo en los procesos de memoria. No obstante, la subunidad GluN2B no es ajena a la funcionalidad de la memoria y se ha observado que la alteración de GluN2B puede condicionar esta función cognitiva en distintos contextos, incluyendo la exposición a EtOH. Varios estudios han encontrado que, en modelos *binge* de EtOH similares al nuestro, se producían deterioros de memoria mediante la activación génica y aumento de la expresión de la subunidad GluN2B y la alteración de los potenciales postsinápticos excitadores de receptores NMDA<sup>107,240</sup>. Todas estas evidencias sugieren que cualquier desequilibrio en la composición de subunidades del receptor NMDA va a derivar en un déficit de memoria y que, por tanto, esta alteración representa una diana terapéutica apropiada de DIM para la prevención del daño cognitivo inducido por el EtOH, que en nuestro caso sería a través de la subunidad GluN2A.

Numerosos estudios han mostrado que el consumo de EtOH interfiere en los eventos de LTP en diversas áreas cerebrales implicando varios sistemas de neurotransmisión, incluyendo, además del glutamatérgico, el GABAérgico, opioide y dopaminérgico<sup>62,241-243</sup>. En nuestro caso, la alteración del equilibrio de subunidades NMDA podría estar alterando los procesos de plasticidad sináptica necesarios para el funcionamiento de la memoria de reconocimiento. Dadas las diferencias en las características cinéticas de las subunidades, el aumento de la ratio GluN2A/GluN2B que hemos observado en nuestros experimentos se traduciría en una mayor probabilidad de apertura, una mayor velocidad de cierre del canal y una menor entrada de Ca<sup>2+</sup>, lo que impactaría sobre las corrientes iónicas a través del mismo<sup>128,130</sup>. Otra consecuencia del aumento de la ratio GluN2A/GluN2B es la modificación de los umbrales de inducción de LTP y LTD: al aumentar la ratio, serían necesarias estimulaciones más potentes para inducir LTP, mientras que se ampliaría el rango de estimulaciones débiles para inducir LTD, generando así un desequilibrio entre ambos procesos<sup>244</sup>. El aumento de la ratio GluN2A/GluN2B producido por nuestro protocolo de *binge* podría inducir una alteración en las propiedades cinéticas de los receptores NMDA y el potencial de membrana, modificando así los procesos de LTP y LTD que gobiernan el establecimiento de la memoria. Por su parte, el tratamiento con DIM equilibra estas alteraciones, consiguiendo de esta manera una protección de la función de memoria.

Finalmente, diversas evidencias apuntan a un posible papel neuroprotector de la subunidad GluN2A<sup>244</sup> que podrían llevarnos a pensar que el aumento de esta subunidad observado en los animales a los que se les administra EtOH sería una respuesta fisiológica dirigida a promover la

supervivencia de neuronas hipocampales ante la exposición a EtOH. Concretamente, GluN2A se ha relacionado con la supervivencia celular mediante la activación del factor CREB<sup>245,246</sup>, que a su vez aumentaría los niveles de expresión de BDNF, promoviendo la señalización por vías antiapoptóticas como medidas para potenciar la supervivencia celular tras un estímulo dañino en el SNC<sup>247,248</sup>. No obstante, en nuestros experimentos no hemos observado cambios en la expresión de CREB que puedan relacionarse con las posibles propiedades neuroprotectoras de un aumento de GluN2A, por lo que parece improbable que el aumento de GluN2A inducido por el EtOH esté dirigido a desencadenar mecanismos de supervivencia en respuesta al daño producido.

El otro receptor ionotrópico estudiado fue el receptor AMPA, a través de su subunidad GluA1. La subunidad GluA1 es fundamental para los procesos de LTP y LTD y para el establecimiento de la memoria a corto plazo<sup>134</sup>. Se ha visto que esta subunidad está implicada en los cambios adaptativos cerebrales inducidos por la exposición a drogas de abuso<sup>249</sup>. En la literatura podemos encontrar trabajos que han observado niveles de GluA1 aumentados en el núcleo accumbens de ratones sometidos a una única sesión de *binge*<sup>250</sup>. También se han obtenido elevaciones en esta subunidad en la región orbitofrontal en cerebros de monos tras el consumo crónico de EtOH<sup>251</sup> o durante la fase de abstinencia tras exposición crónica en cultivos organotípicos de secciones hipocampales de rata<sup>113,252</sup>. Contrariamente, se ha visto que el consumo crónico de EtOH puede disminuir la expresión de GluA1 en el hipocampo de ratones<sup>253</sup>. Asimismo, el consumo de EtOH no solo afecta a la concentración de este receptor, sino que, de manera similar a lo que ocurre con el receptor NMDA, también puede modularlo a nivel funcional, modificando la conductividad sináptica mediante la alteración de las corrientes generadas por este receptor o interfiriendo en la transición entre estados de activación<sup>53,252,254</sup>. Todo esto sugiere que los cambios inducidos por la exposición a EtOH en el receptor AMPA son diversos y dependen del organismo animal usado, modelo de consumo y región cerebral estudiada. Nuestros resultados mostraron que ni el paradigma de *binge* de EtOH ni el cotratamiento con DIM indujeron ningún cambio en la expresión total de este receptor en el hipocampo a ninguna de las horas analizadas.

Adicionalmente, para el receptor AMPA también estudiamos los efectos sobre la incorporación del receptor en la membrana neuronal mediante un ensayo de biotilación de superficie. La presencia de estos receptores en la membrana neuronal se modifica con frecuencia como mecanismo para modular la transmisión sináptica. Teniendo en cuenta que el

## DISCUSIÓN

flujo de iones a través de los receptores AMPA precede y es requerido para la activación de los receptores NMDA, la regulación de la disponibilidad o localización de receptores AMPA en la sinapsis dará lugar a variaciones en la respuesta eléctrica de la neurona<sup>134</sup>. Por tanto, los posibles cambios inducidos por el EtOH en la integración del receptor AMPA en la membrana neuronal podrían ser una diana del tratamiento con DIM. Observamos que la exposición a EtOH aumentaba la presencia del receptor AMPA en la fracción de superficie a 1 y 20 h tras la última administración. Por su parte, el tratamiento con DIM no prevenía este aumento a ninguna de las horas analizadas. Esto viene a confirmar que, si bien no se ve alterada la concentración total, nuestro modelo de *binge* de EtOH promueve la inserción del receptor AMPA en la membrana plasmática.

El tráfico a la superficie neuronal y la localización de este receptor se ven afectados por la exposición a EtOH, como sugiere un estudio con cultivos organotípicos hipocampales donde observaron cambios de expresión en la subunidad GluA1 en homogenados totales, pero no en la fracción postsináptica, revelando una redistribución de la localización del receptor fuera de la hendidura sináptica<sup>252</sup>. Además, se ha observado que el bloqueo del tráfico a membrana de receptores AMPA con subunidades GluA1 en la amígdala basolateral disminuía el consumo de EtOH en un paradigma de autoadministración con ratones C57BL/6J<sup>255</sup>. Todo esto sugiere que el receptor AMPA conformado por subunidades GluA1 es una diana clave en la aparición de eventos neuroplásticos en áreas del circuito de recompensa implicadas en el consumo de EtOH. Estas evidencias van en línea con nuestros resultados, que podrían estar apuntando a un evento de neuroplasticidad hipocampal desencadenado como consecuencia de la exposición repetida a EtOH.

Por otra parte, los receptores AMPA con subunidades GluA1, a diferencia de la GluA2, son permeables al paso de iones  $Ca^{2+}$ , lo que potencia las corrientes eléctricas por estos canales, así como su activación y sus propiedades cinéticas<sup>256</sup>. La alteración en la proporción de estas subunidades es un evento bien descrito para multitud de estímulos, incluida la exposición a diversas sustancias psicoactivas<sup>257-260</sup>. Con esto, podemos hipotetizar que el aumento de la presencia en membrana de receptores AMPA inducido por el modelo de *binge* de EtOH podría estar causando un incremento de la conductividad eléctrica en las neuronas hipocampales mediante la facilitación de corrientes de  $Ca^{2+}$  por canales AMPA-GluA1. Esto conduciría a una sobreestimulación postsináptica mediada por el receptor AMPA, implicada en numerosas patologías neurológicas<sup>135</sup>, que podría estar propiciando el déficit de memoria de

reconocimiento. El tratamiento con DIM carece de capacidad para modular la síntesis o las perturbaciones en el tráfico a membrana del receptor AMPA, por lo que la protección que ejerce sobre la memoria no implica a esta vía. En este contexto, es posible que el aumento de la subunidad GluN2A de los receptores NMDA respondiese a un intento del organismo de disminuir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que, como se ha mencionado anteriormente, las características cinéticas de GluN2A limitan el flujo de este ion<sup>130</sup>. Por su parte, el tratamiento con DIM, mediante la regulación de las subunidades del receptor NMDA, podría estar equilibrando las corrientes eléctricas aberrantes generadas por la mayor presencia en superficie del receptor AMPA, contribuyendo así a la prevención del déficit de memoria de reconocimiento.

Además de los receptores ionotrópicos, decidimos estudiar el estado del receptor metabotrópico mGluR2, que como autorreceptor presináptico, junto con mGluR3, está implicado en modulación negativa de la transmisión excitatoria glutamatérgica y en procesos de LTD<sup>140</sup>. En general, los receptores metabotrópicos han recibido menos atención que los ionotrópicos en cuanto a los efectos deletéreos del EtOH, pero recientemente han acaparado interés por su potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas, desórdenes neuroinflamatorios y abuso de drogas<sup>139,142,261</sup>. Con respecto a su papel en adicción, se ha demostrado su implicación tanto en la conducta de búsqueda de la droga como en el declive cognitivo inducido por el consumo<sup>262</sup>. Hay modelos animales que correlacionan la pérdida de expresión y función de mGluR2 en el circuito corticolímbico con el consumo crónico intermitente de EtOH, lo que a su vez se traduce en una mayor conducta de búsqueda de EtOH<sup>55,263</sup>. En nuestros experimentos, ni el *binge* de EtOH ni el tratamiento con DIM modificaron la expresión de mGluR2 en el curso temporal estudiado. Esto puede estar indicando que un consumo *binge* no es suficiente para inducir cambios en la expresión de este receptor. Por otro lado, se ha demostrado en modelos de consumo de EtOH tipo *binge* que la activación de mGluR2/3 puede prevenir el déficit en aprendizaje espacial<sup>264</sup>. Sin embargo, nuestros datos muestran que el tratamiento con DIM no ejerce acción a través de mGluR2 que pueda estar relacionada con su protección de la memoria.

Finalmente, el análisis del transportador astrocítico EAAT2 reveló que a 20 h DIM produjo un aumento de sus niveles en los ratones sometidos al *binge* de EtOH. Dado que no encontramos en la literatura científica precedente sobre una relación entre EAAT2 y DIM, por primera vez demostramos que el tratamiento con DIM interviene en la modulación de la expresión de EAAT2. Este transportador se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro

## DISCUSIÓN

adulto y es responsable de aproximadamente el 90% de la recaptación del glutamato de la hendidura sináptica, lo que explica su papel fundamental frente a eventos de excitotoxicidad glutamatérgica<sup>144</sup>. Si bien la administración aguda de EtOH tiende a disminuir la liberación de glutamato, hay diversos estudios que han verificado, tras consumo crónico o tras varias exposiciones tipo *binge*, así como en la fase de abstinencia, el aumento de la concentración de glutamato extracelular o alteraciones en proteínas postsinápticas implicadas en la señalización por glutamato en áreas cerebrales como el núcleo accumbens o el área tegmental ventral<sup>157,265,266</sup>. Aunque no disponemos de información sobre la concentración extracelular de glutamato, el aumento del receptor EAAT2 podría generar un mecanismo dirigido a compensar un posible exceso de niveles sinápticos de glutamato y así disminuir la sobreestimulación postsináptica.

Esta propiedad de DIM concordaría con estudios recientes que han revelado un posible uso terapéutico de los fármacos N-acetilcisteína y riluzol. La N-acetilcisteína es un derivado del aminoácido cisteína con propiedades reguladoras sobre la transmisión glutamatérgica, en particular, a través de la estimulación del transportador EAAT2. Hay estudios que relacionan directamente la disminución de la expresión o la funcionalidad de EAAT2 con déficits cognitivos de memoria en modelos de enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia o daño hepático<sup>49,147,148</sup>, por lo que cabe pensar que una activación de este receptor podría beneficiar a la función de la memoria. De hecho, hay estudios que han mostrado que el tratamiento con N-acetilcisteína puede aliviar déficits de memoria inducidos en distintos modelos patológicos, como enfermedad de Alzheimer, envejecimiento o intoxicación por cadmio<sup>267-269</sup>. Asimismo, la N-acetilcisteína se ha propuesto como potencial tratamiento frente a la adicción a diversas drogas<sup>270</sup>. Estudios preclínicos y clínicos demostraron que el tratamiento con N-acetilcisteína es eficaz para reducir el consumo de diversas drogas, incluyendo alcohol<sup>126,271,272</sup>. Por otro lado, un estudio con un modelo de envejecimiento en ratas demostró que el tratamiento con el fármaco riluzol, aprobado para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, aumentó la expresión de EAAT2, lo que ellos sugieren como un posible mecanismo terapéutico ante el declive cognitivo derivado de la edad<sup>273</sup>. En concordancia con esto, un estudio en un modelo de enfermedad de Alzheimer con ratas inducido por administración intrahipocampal del péptido amiloide A $\beta_{1-42}$  mostró una mejoría del déficit de memoria espacial y la LTP hipocampal tras el tratamiento con riluzol. Los efectos del riluzol se relacionaron la recuperación del equilibrio entre la señalización glutamatérgica y GABAérgica mediante la inhibición del aumento de los niveles de glutamato extracelular<sup>274</sup>. Con todas estas evidencias, nuestros datos respaldan la propiedad de DIM de aumentar la expresión de EAAT2 tras la exposición a EtOH como un

mecanismo que podría estar dando lugar a la protección de memoria de reconocimiento observada en el test NOR.

A modo de resumen, nuestro paradigma de *binge drinking* interfiere en la homeostasis de la señalización glutamatérgica mediante la alteración del equilibrio entre las subunidades GluN2A y GluN2B del receptor NMDA y el tráfico a membrana del receptor AMPA. Esta interferencia en la neurotransmisión glutamatérgica hipocampal se puede asociar al déficit de memoria de reconocimiento a corto plazo. Por su parte, el tratamiento con DIM previene el daño de memoria a 20 h tras la última exposición a EtOH, efecto que se correlaciona con la prevención del desequilibrio entre subunidades NMDA y con un aumento de la concentración del transportador EAAT2. De esta manera, podríamos sugerir que DIM estaría promoviendo una estrategia sinérgica para modular la transmisión glutamatérgica, regulando, por un lado, la homeostasis entre GluN2A y GluN2B y, por otro, aumentando la síntesis de EAAT2 en respuesta a un posible aumento de glutamato extracelular.

- A través de la degradación de la ECM, las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 participan en los cambios plásticos necesarios para la reorganización de las conexiones cerebrales durante los procesos de aprendizaje y memoria<sup>72</sup>.

Mientras que MMP-2 no se ve modificada de manera relevante en el periodo de tiempo analizado, MMP-9 sufre oscilaciones en su actividad proteolítica inducidas por el *binge* de EtOH, que no pueden ser asociadas a cambios en la expresión proteica. El *binge* de EtOH produce una reducción acusada de la actividad de MMP-9 1 h después de la última administración, induce una tendencia al alza a las 3 h tras la última inyección frente a los controles y, finalmente, a 20 h tras el último *binge*, la actividad metaloproteasa en los animales sometidos al *binge* de EtOH es significativamente mayor que en los animales control. Hay datos en la literatura científica que respaldan los diversos efectos que la exposición a EtOH puede ejercer sobre la actividad y expresión de MMP-9. La aplicación de una única dosis de EtOH disminuyó la actividad de MMP-9 en hipocampo y corteza prefrontal de ratas 2, 4 y 6 días más tarde<sup>275</sup>. Otro estudio en ratas encontró elevaciones de los niveles de ARN y de la forma activa de MMP-9 en hipocampo y corteza prefrontal en tratamiento agudo y a corto y largo plazo tras la exposición a EtOH con un modelo de acceso intermitente crónico<sup>154</sup>. En secciones organotípicas corticales de ratones neonatos, la exposición a EtOH bloqueó la actividad proteolítica de MMP-9 inducida por la liberación de glutamato<sup>156</sup>. En tejido *postmortem* de

## DISCUSIÓN

humanos con historia clínica de dependencia a EtOH, se ha encontrado un aumento de la actividad de MMP-9 en la corteza prefrontal dorsolateral<sup>276</sup>. Por tanto, como evidencian estos trabajos, el EtOH puede modular tanto la actividad como la expresión de MMP-9 de manera específica según la región cerebral, el modelo de consumo o el momento de análisis.

Las MMP han ido adquiriendo atención como factor clave en plasticidad sináptica y, de especial interés para nosotros, en eventos de aprendizaje y en el establecimiento de varios tipos de memoria<sup>72</sup>. En secciones hipocampales de rata, se describió que MMP-9 se activaba tras la inducción química de estímulos de LTP y que la aplicación de un inhibidor de MMP-9 bloqueaba por completo la LTP en el área CA1 hipocampal. Además, también observaron que 1 h tras la inducción de LTP los niveles de la forma activa de MMP-9 habían incrementado<sup>70</sup>. Más tarde, el mismo grupo comprobó *in vivo* que los niveles de expresión y de actividad de MMP-9 se elevaban tras sesiones de aprendizaje de evitación inhibitoria<sup>157</sup>. Estudios con ratones *knock-out* para MMP-9 desvelaron una disminución de la motivación por la búsqueda del EtOH en un paradigma de autoadministración y alteraba la densidad y morfología de las espinas dendríticas en la amígdala central. Con sujetos humanos, la inhibición de MMP-9 mediante doxiciclina producía un daño en extinción de memoria y reaprendizaje<sup>277</sup>. En conjunto, estos estudios sugieren que distintos aspectos de la función de memoria están asociados al aumento de la expresión o la actividad de MMP-9.

En nuestros resultados, contrariamente, el déficit de memoria de reconocimiento coincide en el tiempo con el aumento de actividad de MMP-9. Una posible explicación a esta discrepancia es que la subida de actividad proteolítica se debe a la administración de EtOH y no funciona como un mecanismo de plasticidad inducido por la exposición previa a una prueba de conducta. Podemos hipotetizar, por tanto, que la sobreactivación de MMP-9 por la ingesta de EtOH está impidiendo su funcionamiento fisiológico normal, dificultando la memoria a corto plazo. De hecho, en enfermedades neurodegenerativas, la alteración en MMP-9 propicia la degradación de proteínas fundamentales para la transmisión sináptica, como sería el caso de la proteína básica de mielina. Consecuentemente, el impulso nervioso se ve entorpecido o impedido, desencadenando la aparición de déficits cognitivos<sup>152,278,279</sup>. De manera similar, en un modelo de recuperación de laparotomía, el déficit de memoria espacial postquirúrgico se podía relacionar con un aumento de la expresión de MMP-9 y una disminución de su inhibidor TIMP-3 en el hipocampo, mientras que la recuperación del balance MMP-9/TIMP-3, alivió el daño cognitivo<sup>280</sup>. Por lo tanto, podemos sugerir que el aumento de la actividad de MMP-9

incitado por el EtOH impide su correcto funcionamiento fisiológico, traducándose en el déficit de la memoria de reconocimiento.

DIM produjo una disminución de la actividad proteolítica de MMP-9 a 20 h post-*binge*, coincidiendo con la prevención del déficit de memoria. Además, este efecto también se observó a las 3 h post-*binge*, aunque solo en el grupo EtOH + DIM en comparación con los que solo recibieron EtOH. No es del todo inesperado este mecanismo, dado que el tratamiento con DIM puede inhibir la actividad y expresión de MMP-9 en diversos modelos experimentales, incluyendo sinoviocitos de artritis reumatoide, cáncer de tiroides o cáncer de endometrio<sup>281-283</sup>. En el caso del cáncer, la invasión y migración de células tumorales malignas se favorece por la sobreactivación de MMP-9<sup>164</sup>, de ahí que su inhibición suponga una propiedad antimetastásica de DIM. Por tanto, el bloqueo de la actividad de MMP-9 por el tratamiento con DIM puede estar impidiendo los efectos negativos del exceso de actividad proteolítica sobre la memoria de reconocimiento. Además, otro factor que puede estar impactando en la alteración de la actividad de MMP-9 es el receptor NMDA. El aumento de actividad metaloproteasa a las 20 h en los animales expuestos a EtOH coincide con el incremento de GluN2A, por lo que el aumento de señalización por el receptor NMDA favorece la mayor actividad de MMP-9, como se ha descrito en trabajos previos<sup>70,284</sup>. Por su parte, como el tratamiento con DIM disminuye los niveles de GluN2A, es posible que esta acción también contribuya de manera sinérgica a la reducción de la actividad de MMP-9 en los animales cotratados con DIM. En sentido opuesto, MMP-9 puede intervenir y regular específicamente el tráfico de receptores NMDA a membrana<sup>159</sup>. Por tanto, las perturbaciones en la actividad de MMP-9 pueden alterar la incorporación de receptores NMDA en la membrana neuronal, aportando así a la disfunción de memoria.

Como se ha comentado anteriormente, la actividad de MMP-2 no se vio gravemente modificada ni por el *binge* de EtOH ni por el tratamiento con DIM. Al contrario que la inducible MMP-9, MMP-2 se expresa constitutivamente en el cerebro adulto<sup>285</sup>, por lo que resulta lógico que las alteraciones en esta metaloproteasa fueran menos marcadas. Aunque en la literatura se pueden encontrar evidencias de perturbaciones en la actividad o expresión de MMP-2 asociadas tanto a la exposición a EtOH como al daño en funciones cognitivas<sup>286,287</sup> y DIM también puede modificar los niveles de expresión o actividad de MMP-2<sup>281,282</sup>, en nuestros experimentos parece improbable que MMP-2 intervenga en el déficit de memoria de reconocimiento inducido por el EtOH o la prevención tras el tratamiento con DIM.

## DISCUSIÓN

En conjunto, los datos recogidos en este bloque de experimentos revelan que el *binge* de EtOH es capaz de ejercer acciones moduladoras específicamente sobre la actividad de MMP-9, sin modificar la expresión de la proteína. Además, el tratamiento con DIM también influye en los niveles de actividad de MMP-9, de manera que su efecto neuroprotector sobre la memoria coincide temporalmente con una prevención del aumento de la actividad de la metaloproteasa. En este punto, es plausible que DIM este deteniendo una activación aberrante de MMP-9 que genere interferencias en el correcto funcionamiento de la memoria de reconocimiento a corto plazo.

- El alcohol se ha postulado como uno de los numerosos factores que afectan a la neurogénesis hipocampal, habiéndose demostrado repetidamente que inhibe marcadores de proliferación neural tanto en roedores como primates no humanos<sup>288,289</sup>.

La pérdida de neurogénesis debida al consumo de EtOH es especialmente preocupante en el caso de adolescentes, donde se ha observado que dicho descenso persiste hasta la edad adulta incluso tras la abstinencia<sup>216,290</sup>. Las neuronas de nueva formación procedentes de la zona subgranular del hipocampo se integran en los circuitos hipocampales a través de la capa granular del giro dentado y se sabe que están implicadas en las funciones cognitivas hipocampales desde antes de alcanzar la madurez celular<sup>291,292</sup>. Por ejemplo, en un modelo de enfermedad de Alzheimer, la regulación de la extensión de las dendritas en células DCX positivas se relacionó con un mejor desempeño en la prueba de memoria espacial del laberinto de agua de Morris<sup>293</sup>. El papel de la neurogénesis hipocampal en los procesos de aprendizaje y memoria aún no ha sido esclarecido en su totalidad, pero el consenso dicta que los distintos eventos de cognición se facilitan mediante la neurogénesis<sup>173</sup>.

Nuestros datos muestran una reducción del número de neuronas inmaduras tras el *binge* de EtOH. La disminución del número de neuronas DCX positivas por la exposición a EtOH no es un resultado inesperado: la literatura contiene un buen número de estudios que reportan este efecto en consumo crónico<sup>294</sup>, acceso intermitente a EtOH<sup>216,290</sup> o protocolos de *binge*<sup>295</sup>, así como en muestras *postmortem* de pacientes alcohólicos<sup>296</sup>. Por su parte, nuestros resultados indican que el tratamiento con DIM en animales expuestos a EtOH mantiene el número de neuronas DCX positivas a niveles equivalentes a los de los animales control, es decir, previene la pérdida de neuronas inmaduras inducida por el *binge* de EtOH, resultado que, además, se correlaciona con la mejora observada en la prueba de reconocimiento de objeto. De acuerdo

con nuestros resultados, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la generación de nuevas neuronas inmaduras y una mayor puntuación en el índice de discriminación en la prueba de reconocimiento de objeto<sup>216</sup>. Un trabajo reciente ha demostrado que los indoles derivados de la microbiota, como el grupo de los glucosinolatos (al que pertenece DIM), promueven la neurogénesis a través de AhR, lo que no ocurre con otros ligandos del receptor, como la kinurenina<sup>297</sup>. Más allá de eso, en la literatura, no hay mención expresa a alguna relación entre DIM y la protección de la neurogénesis, por lo que nuestro resultado representa la primera evidencia a este respecto. Podemos pensar, entonces, que la preservación de neuronas inmaduras por el tratamiento con DIM tras la exposición al *binge* de EtOH es clave para la protección de la memoria observada en la prueba NOR, lo cual ya se ha demostrado con otros tipos de pruebas cognitivas<sup>298</sup>.

A continuación, evaluamos el efecto de DIM sobre las alteraciones en la supervivencia de células nerviosas de nueva generación inducidas por el EtOH. En primer lugar, nuestros resultados muestran que el protocolo de *binge* de EtOH disminuye el número de neuronas maduras de nueva formación. Está bien establecido que el consumo de EtOH disminuye el número de neuronas maduras en el hipocampo y otras áreas del cerebro tanto en modelos animales como en humanos<sup>299-301</sup>. Por tanto, nuestros experimentos ratifican que el periodo de maduración de las neuronas es especialmente vulnerable a la exposición a EtOH y que el consumo tipo *binge* de EtOH afecta a la supervivencia de células inmaduras en diferenciación. Sin embargo, es contraintuitivo que el tratamiento con DIM no ejerza en este caso el mismo efecto protector que hemos observado para las células DCX<sup>+</sup>. Es posible que esta falta de protección de DIM para la supervivencia neuronal se deba al momento en el que se administra: cuando se administra por primera vez DIM, estas células casi han completado su diferenciación, por lo que han tenido que atravesar todo el protocolo de *binge* mientras iban madurando y, dada la sensibilidad de este periodo, es probable que muchas de esas células se hayan perdido por la exposición a la droga. En cambio, en el caso de las células DCX<sup>+</sup>, el tratamiento con DIM se aplica cuando están en esa fase de maduración y es posible que las acciones desplegadas por DIM protejan a estas células. Cabe especular, por tanto, que un tratamiento a largo plazo con DIM, por ejemplo, desde el comienzo del protocolo de *binge* de EtOH, podría ser beneficioso para la restauración de la neurogénesis hipocampal, pudiendo ser una alternativa para prevenir el déficit de memoria a 7 días, del cual no vemos prevención con el tratamiento de 4 dosis de DIM. Sin embargo, y a falta de experimentos adicionales que determinen el número total de nuevas neuronas maduras en tiempos posteriores, hay que ser cautos a la hora de extrapolar

## DISCUSIÓN

entre las neuronas inmaduras marcadas con DCX y los niveles de células maduras futuras, ya que se ha sugerido que la relación entre los niveles de neurogénesis del hipocampo adulto y la expresión de DCX no es lineal<sup>302</sup> y que esta proteína no es imprescindible para la supervivencia de nuevas neuronas<sup>303</sup>.

En el caso de la microglía, observamos el efecto contrario que para las neuronas maduras: los animales que recibieron dosis de EtOH mostraban una mayor proporción de células que colocalizan BrdU<sup>+</sup> / Iba-1<sup>+</sup>. Este dato coincide con un estudio en el que demostraron que, tras un *binge* de EtOH en 4 días consecutivos, la irrupción temprana de proliferación celular correspondía con el aumento del comarraje de BrdU<sup>+</sup> / Iba-1<sup>+</sup><sup>304</sup>. Un trabajo posterior, además, demostró que la administración de EtOH tipo *binge* durante el periodo adolescente disparó un evento de proliferación microglial que se mantuvo hasta la adultez<sup>305</sup>. Es importante tener en cuenta que neuronas y astrocitos comparten un mismo progenitor original, la glía radial, mientras que la microglía procede de nichos proliferativos diferentes y puede dividirse posteriormente a lo largo de su vida<sup>176,179</sup>. En los animales expuestos a EtOH se podría estar manteniendo el fenotipo activo de la microglía que se comenzó a dividir previamente a la entrada en el protocolo *binge* para reparar el daño que se produce por el EtOH, mientras que en los animales control esta microglía podría encontrarse en un estado inactivo. Por otra parte, no podemos obviar el papel regulador de la microglía madura en los procesos de neurogénesis: durante la proliferación neuronal, solo una proporción de los progenitores que comienzan a dividirse completa su diferenciación y genera finalmente neuronas maduras que se insertan en la circuitería del hipocampo, mientras que el resto de células que comenzaron a dividirse cometen apoptosis y son fagocitadas por la microglía para evitar el vertido de contenido intracelular en el espacio extracelular<sup>306</sup>. Con todo esto, en nuestro modelo, la mayor proporción de microglía en los animales expuestos a EtOH podría estar actuando en los procesos de neurogénesis retirando restos celulares de neuronas que no han alcanzado la madurez.

En resumen, los experimentos de neurogénesis han revelado que el *binge* de EtOH produce una disminución del número de nuevas neuronas maduras e inmaduras, según los marcadores NeuN y DCX, respectivamente, lo que podría estar directamente asociado con el deterioro de memoria en la prueba de reconocimiento de objeto. El EtOH, además, aumenta la proporción de microglía activa de nueva generación. El tratamiento con DIM previene la disminución de neurogénesis inducida por EtOH, lo que potencialmente podría estar implicado en el correcto

funcionamiento de la memoria de reconocimiento, ya que constituye un proceso de reparación hipocampal ante el daño por la exposición a EtOH.

- A raíz de los resultados en los experimentos de supervivencia de células neurales de nueva generación y de neuronas inmaduras, decidimos estudiar los niveles de expresión de BDNF, su receptor diana TrkB, la proteína kinasa Akt y el factor de transcripción CREB.

La neurotrofina BDNF es una de las principales mediadoras de la neurogénesis adulta y tiene un papel importante en procesos cognitivos y plasticidad<sup>307</sup>. Las evidencias disponibles en la literatura sobre los efectos del EtOH en los niveles de BDNF ofrecen datos heterogéneos. En el hipocampo, se ha visto que los niveles proteicos de BDNF se encuentran aumentados inmediatamente después de finalizar la exposición a EtOH en un modelo de consumo voluntario durante 3 semanas<sup>308</sup>, mientras que tras 8 días de abstinencia había disminuido la expresión, con respecto a los animales control<sup>309</sup>. En cuanto a la expresión génica, una única dosis de EtOH causó una elevación de sus niveles en hipocampo y estriado 45 minutos más tarde<sup>310</sup>. En un modelo de exposición a vapores de EtOH durante 4 semanas se observó un aumento de la expresión del ARN mensajero de BDNF en el área CA3 y una disminución en CA1 tras 12 h de abstinencia, demostrando cambios específicos de región<sup>311</sup>. Los estudios en pacientes con trastorno por uso de alcohol muestran una disminución de los niveles de BDNF en plasma sanguíneo<sup>312</sup>, mientras que durante la abstinencia se encontró una elevación<sup>313</sup>. Todo esto demuestra que la modificación de los niveles de BDNF tras la exposición a EtOH es muy dinámica y dependiente de varios factores, como el tipo de consumo, el área cerebral estudiada y el punto temporal de recogida de muestra tras el consumo<sup>314</sup>. Por su parte, en la literatura solo encontramos un artículo que relaciona la administración de DIM con la regulación de los niveles de BDNF. En este trabajo, el pretratamiento con DIM previno, de manera dosis-dependiente, la reducción en BDNF inducida por un estado hiperglutamatérgico en células hipocampales HT-22<sup>195</sup>.

Nuestros resultados mostraron, a 20 h post-*binge*, una elevación de BDNF en los animales expuestos a EtOH, mientras que el tratamiento con DIM aumentó la expresión de dicha neurotrofina a 3 h tras la última administración. Podemos pensar que el incremento de BDNF en el grupo EtOH + DIM a 3 h post-*binge* permite un inicio temprano de las acciones beneficiosas de BDNF, contribuyendo a la protección de memoria a las 20 h. En los animales que solo recibieron EtOH, por el contrario, no se observa el aumento de BDNF hasta las 20 h,

## DISCUSIÓN

por lo que es posible que, en este caso, los efectos de BDNF no hayan llegado a tiempo para ejercer una prevención del déficit de memoria. No obstante, debemos ser cautos con estos datos, ya que, si bien son estadísticamente significativos, los aumentos observados son discretos y cabe pensar que su impacto en el desempeño de la prueba de memoria no sea fisiológicamente relevante. Esto se justifica en base a dos hechos: en primer lugar, según demuestran nuestros experimentos de supervivencia neuronal, el incremento en BDNF no concuerda con la pérdida de neuronas de nueva formación o de neuronas inmaduras en los animales sometidos a EtOH; en segundo lugar, como veremos más adelante, los intermediarios en la cascada intracelular de BDNF, como son CREB y Akt, no sufren alteraciones en nuestros experimentos que puedan explicar un aumento en su vía de señalización.

Hay otros factores que pueden estar influyendo en la variación de los niveles de BDNF, dos de ellos de especial interés para esta Tesis Doctoral: MMP-9 y el receptor NMDA. Numerosos trabajos han mostrado que la regulación de los niveles de BDNF está regida por MMP-9, ya que cataliza el paso de proBDNF a BDNF, como se ha comprobado en modelos de enfermedad de Alzheimer o autismo<sup>315,316</sup>. La desregulación de la actividad de MMP-9 altera los niveles de BDNF, lo que se puede asociar a anormalidades conductuales y cognitivas y deficiencias en los mecanismos de plasticidad sináptica<sup>317</sup>. Dado que nuestros experimentos revelan un aumento de la activación de MMP-9 en los animales expuestos a EtOH coincidiendo a las 20 h, podemos suponer que esta es una de las razones por las que encontramos el incremento en los niveles de BDNF. Por su parte, la relación entre BDNF y el receptor NMDA se desarrollará en más detalle a continuación, en la discusión sobre los niveles de TrkB.

La fosforilación del receptor TrkB pone en marcha las cascadas intracelulares de señalización de BDNF y, mediante la autofosforilación del residuo tirosina 816 (pTrkB Tyr816), se relaciona con la regulación de eventos de plasticidad sináptica y neurotransmisión<sup>318,319</sup>. Nuestros datos muestran un incremento de los niveles pTrkB Tyr816 tras la exposición a EtOH únicamente en la forma no glicosilada, o inmadura, con respecto a los animales control, mientras que el cotratamiento con DIM disminuía los niveles, tanto en la forma madura como en la inmadura, en comparación con los que solo recibían EtOH. Esto parece estar indicando una activación temprana del receptor debido a la exposición a EtOH, la cual desaparece en un periodo corto de tiempo.

La señalización por TrkB está relacionada con el consumo de EtOH. Varios estudios en distintos modelos de ingesta de EtOH han analizado la modulación farmacológica de este

receptor, tanto por agonismo como por antagonismo, obteniendo resultados heterogéneos en cuanto a la alteración del consumo de EtOH<sup>308,320-322</sup>. Además, en modelos de consumo de EtOH, TrkB se ha propuesto como diana contra los efectos cognitivos del EtOH. Se ha observado que el tratamiento con 7,8-dihidroxi flavona, un farmacomimético de BDNF, puede aliviar el déficit de memoria espacial inducido por el consumo de EtOH mediante varios mecanismos, incluyendo el aumento de los niveles de BDNF, la regulación de los niveles de estrés oxidativo e inflamación y la inhibición de la muerte celular<sup>323</sup>. Más aún, un estudio en un modelo animal de enfermedad de Huntington ha descubierto que los efectos beneficiosos de 7,8-dihidroxi flavona sobre la memoria de reconocimiento están mediados por la fosforilación de TrkB en Tyr816<sup>324</sup>. Con todo esto, cabría pensar que la vía de señalización de BDNF/TrkB puede atajar la disfunción cognitiva derivada del consumo de EtOH. En el estudio de Lee et al. (2020)<sup>195</sup> comentado anteriormente, la administración de DIM a un cultivo de células hipocampales de la línea HT-22 sometidas a *shock* glutamatérgico aumentaba los niveles de pTrkB, aunque esta vez en su residuo Tyr516. Esto no va en paralelo con nuestro resultado, ya que nosotros observamos una disminución de la fosforilación. Es posible que esta disparidad se deba a diferencias en el modelo experimental, desde la comparación entre cultivos celulares con administración in vivo hasta el efecto diferencial de la fosforilación de aminoácidos distintos. No obstante, dada la temporalidad del efecto de DIM que hemos obtenido en nuestro experimento, de nuevo es improbable que el efecto protector de la memoria que DIM posee sea debido a su modulación sobre la señalización por TrkB.

Como se ha adelantado en la sección previa, BDNF y TrkB interactúan con el receptor NMDA, lo que les confiere un papel en la LTP dependiente de dicho receptor. BDNF es capaz de potenciar la liberación de glutamato y de incrementar la frecuencia de corrientes excitatorias espontáneas postsinápticas<sup>325</sup>. En el hipocampo, se ha descrito que TrkB se distribuye entre el axón, los terminales nerviosos y en las espinas dendríticas de neuronas glutamatérgicas, repartido de manera equitativa entre la zona presináptica activa y la densidad postsináptica, justificando las acciones presinápticas de BDNF<sup>326,327</sup>. En la dirección contraria, se sabe que la activación del receptor NMDA produce un incremento de las concentraciones de BDNF, lo que a su vez se asocia a una mayor tasa de supervivencia de células hipocampales<sup>328</sup>. Más aún, la influencia de BDNF sobre los procesos de LTP sigue una dinámica Hebbiana, en tanto que estimulaciones de baja frecuencia que no consiguen activar los receptores NMDA previenen las corrientes glutamatérgicas inducidas por BDNF<sup>329</sup>. Por tanto, existe una comunicación bidireccional entre el receptor NMDA y la ruta de BDNF-TrkB con un importante rol en la

## DISCUSIÓN

modulación de la neurotransmisión glutamatérgica y el establecimiento de los eventos de plasticidad.

En condiciones patológicas o de daño celular, como las que podemos encontrar tras el *binge* de EtOH, las acciones de BDNF se pueden dirigir hacia la prevención de un exceso de neurotransmisión glutamatérgica. Si bien BDNF se asocia fisiológicamente con la activación de los receptores NMDA, un estudio con un modelo animal de enfermedad de Huntington ha comprobado que BDNF ejerció un papel protector mediante la señalización por TrkB reduciendo la excitotoxicidad glutamatérgica inducida por NMDA<sup>330</sup>. En nuestros experimentos, a las 20 h tras la última administración de EtOH, coincide el aumento de la subunidad GluN2A con el aumento de los niveles de BDNF, lo que podría estar indicando una respuesta orgánica para limitar la posible excitotoxicidad a través de estos receptores. A pesar de esto, dado que en este punto temporal no hemos visto alteraciones en el receptor TrkB y que BDNF también está aumentado en los animales cotratados con DIM (con niveles de GluN2A y función de memoria normales), es improbable que la modulación de la señalización por BDNF esté participando de manera determinante a la protección de la memoria inducida por el tratamiento con DIM.

Las dos últimas proteínas implicadas en las rutas de señalización de BDNF fueron la kinasa Akt y el factor de transcripción CREB en sus formas fosforiladas en los residuos serina 473 (pAkt Ser473) y serina 133 (pCREB Ser133), respectivamente. Ni el *binge* de EtOH ni el tratamiento con DIM supusieron ningún cambio en los niveles de expresión de ambas proteínas a las horas estudiadas. CREB es directamente fosforilado en Ser133 por Akt, provocando la activación y traslocación nuclear de pCREB y, así, promoviendo la transcripción de genes implicados en supervivencia celular. Concuerdia, entonces, que la ausencia de cambios en pCREB y pAkt vayan en paralelo.

Se sabe que la vía de señalización de Akt está implicada en la ingesta de EtOH. Se ha demostrado una marcada reducción del consumo de EtOH en ratones macho tras el bloqueo de Akt o de mTOR, proteína diana e intermediaria en su cascada mensajera<sup>331,332</sup>. Por su parte, CREB también sufre alteraciones debidas a la exposición a EtOH, de manera que, generalmente, el consumo agudo de EtOH aumenta los niveles de pCREB, mientras que el consumo crónico y la posterior abstinencia los disminuye<sup>333</sup>. Las consecuencias del consumo de EtOH sobre la funcionalidad de CREB pueden mantenerse a largo plazo. Por ejemplo, el consumo intermitente de EtOH durante la adolescencia genera modificaciones epigenéticas que reducen

la expresión y fosforilación de CREB, lo cual se mantiene en la edad adulta<sup>334</sup>. A pesar de esto, nuestro paradigma de *binge* no ejerce ninguna acción sobre los niveles de estas proteínas, ni tampoco observamos cambios en los niveles debido al tratamiento con DIM, como sí los reportan en el estudio de Lee et al. (2020)<sup>195</sup>. De nuevo, no podemos descartar la posibilidad de que la ausencia de cambios se deba a diferencias experimentales, temporales o de muestra.

En definitiva, el estudio de elementos de la señalización por BDNF reveló, en primer lugar, ligeros efectos de elevación de los niveles de esta neurotrofina en los animales expuestos a EtOH, coincidiendo con el momento de realización del test NOR. Este aumento de BDNF podría ser consecuencia directa del aumento de actividad proteolítica de MMP-9 o de la mayor presencia de receptores NMDA-GluN2A. Por su parte, DIM aumentó los niveles de BDNF 3 h tras la última administración y disminuyó la fosforilación del receptor TrkB a 1 h post-*binge*. No obstante, dada la temporalidad y la magnitud de los cambios, la contribución de estas modulaciones a la neuroprotección de la memoria parece poco probable.

- Dado que el cerebro es uno de los órganos que más energía consume, tanto en forma de ATP como de glucosa, el correcto funcionamiento de la mitocondria, orgánulo responsable de la capacidad energética celular, es fundamental para la viabilidad de la neurona.

La aparición de fallos en los procesos de fusión-fisión mitocondrial, eventos implicados en la funcionalidad, distribución y mantenimiento de la mitocondria, se ha relacionado con distintas patologías neurológicas y degenerativas, así como con perturbaciones en la neuroplasticidad y neurogénesis<sup>335</sup>. De este modo, exploramos una batería de enzimas encargadas de la dinámica de fusión-fisión mitocondrial. Las proteínas de fusión-fisión mitocondrial no sufrieron cambios en sus niveles de expresión debido a la exposición a EtOH. En cuanto al tratamiento con DIM, solo causa efectos sobre una de ellas: la fosforilación de pDRP-1 Ser616, clave para iniciar la fisión mitocondrial mediante la localización de DRP-1 en la membrana mitocondrial<sup>336</sup>, se reduce marcadamente en los animales tratados con DIM, hayan o no estado sometidos al *binge* de EtOH.

Aunque no hay antecedentes en la literatura sobre la interferencia de DIM sobre esta fosforilación en específico, la interacción entre DIM y la mitocondria está documentada, más concretamente, en relación con sus propiedades antitumorales. En células tumorales prostáticas, DIM indujo apoptosis por la vía mitocondrial mediante la activación de las caspasas

## DISCUSIÓN

9, 3 y 6<sup>337</sup>. En un estudio con células humanas de cáncer de mama, se demostró que DIM redujo la síntesis de ATP e inhibió la proliferación celular a través del bloqueo de la ATP sintasa<sup>338</sup>. Podemos inferir que la acción de DIM sobre pDRP-1 Ser616 probablemente forme parte del conjunto de efectos anticancerígenos de DIM, siendo nuestro resultado la primera evidencia de este mecanismo.

Por otro lado, DRP-1 puede estar implicada en procesos cognitivos. En un estudio se observó que la inhibición de la fosforilación de DRP-1 atenuaba el daño neuronal hipocampal y el déficit cognitivo inducidos por la exposición crónica a EtOH<sup>339</sup>. Además, en modelos de enfermedad de Alzheimer, donde los eventos de fisión mitocondrial se desregulan por exceso en las etapas tempranas de la enfermedad, se ha propuesto DRP-1 como una diana terapéutica en el tratamiento del daño cognitivo característico de esta patología<sup>340</sup>. En un estudio con ratas se relacionó la reducción de la disponibilidad de DRP-1 en la mitocondria con la mejora en los síntomas cognitivos en la prueba del laberinto de agua de Morris<sup>341</sup>. Otro trabajo con ratones transgénicos con fenotipo de enfermedad de Alzheimer de inicio temprano demostró que la inhibición de DRP-1 mejoraba la memoria espacial según el laberinto de Morris y el aprendizaje asociativo en un test de evitación pasiva<sup>342</sup>. Podemos deducir, por tanto, que la disminución de pDRP-1 Ser616 ejercida por DIM puede estar colaborando con la neuroprotección de la memoria.

- Diversas evidencias en la literatura han sugerido que la capacidad neuroprotectora de DIM se puede asociar a su potencial antioxidante, por ejemplo, mediante la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes.

Es por ello que, en último lugar, decidimos analizar la expresión de proteínas con función antioxidante, como catalasa, HO-1, NOX-2, NQO-1 y las superóxido dismutasas 1 y 2. Contrario a lo esperado, el tratamiento con DIM no modifica los niveles de expresión de ninguna de estas proteínas. En cuanto a la exposición a EtOH, únicamente HO-1 muestra cambios, observándose una ligera elevación sus niveles. Este dato podría estar en concordancia con el aumento de la microglía en los animales sometidos al *binge* de EtOH, ya que son las principales sintetizadoras de HO-1, junto con los astrocitos. La expresión de HO-1, se desata rápidamente ante una variedad de estímulos estresantes para ofrecer protección ante daño oxidativo<sup>343</sup>. El consumo de EtOH induce la síntesis de ROS en el cerebro, siendo el hipocampo especialmente vulnerable a los daños ocasionados por estas sustancias<sup>344,345</sup>. Por tanto, sería

lógico encontrar aumentos en las defensas antioxidantes para combatir los efectos de ROS en esta área cerebral. Por otro lado, HO-1 se ha considerado clásicamente un agente antioxidante, pero recientemente se ha puesto el foco en su capacidad antiinflamatoria, por su potencial contra enfermedades caracterizadas por inflamación crónica<sup>346</sup>. Se sabe que el consumo de EtOH, incluyendo el consumo *binge*, genera una respuesta proinflamatoria en el SNC, en gran medida debida a alteraciones en la microbiota a través del eje intestino-cerebro<sup>37,347-349</sup>. Es posible, igualmente, que el *binge* de EtOH haya desencadenado eventos proinflamatorios y que una de las medidas compensatorias fisiológicas haya sido la subida de los niveles de HO-1. No obstante, dado que el resto de las proteínas no presentan modificaciones en su concentración, no parece que el daño oxidativo o inflamatorio por el *binge* de EtOH sea muy acusado ni tenga un impacto importante sobre la disfunción de la memoria. Aunque resulta sorprendente que DIM no haya modificado los niveles de ninguna de estas proteínas, sería interesante valorar si el efecto del EtOH o de DIM sobre una regulación de los niveles de enzimas antioxidantes aparecieran a un plazo de tiempo más agudo y que, por tanto, estuviéramos analizando los niveles de estas enzimas en una fase de retorno basal.

En resumen, nuestro protocolo de *binge* múltiple y el tratamiento con DIM ejercieron acciones discretas sobre los dos últimos ejes estudiados. La disminución de la fosforilación de DRP-1 tras el tratamiento con DIM puede estar relacionada con el efecto protector de la memoria, así como con las propiedades antitumorales del compuesto. Por su parte, el sutil incremento de la enzima HO-1 en los animales expuestos al *binge* de EtOH podría ser una medida antiinflamatoria o antioxidante para combatir el daño producido por el EtOH.



---

# Conclusiones

Conclusions

---



## CONCLUSIONES

Del conjunto de los resultados presentados se extraen las siguientes conclusiones:

- I. El tratamiento con cuatro dosis de 3,3'-diindolilmetano (DIM) previene el déficit de memoria de reconocimiento de objeto inducido por la exposición a EtOH tipo *binge* de manera transitoria.
- II. El efecto neuroprotector de DIM se asocia con una modulación de la homeostasis del sistema de neurotransmisión glutamatérgico en el hipocampo. El tratamiento con DIM previene el desequilibrio en la expresión de las subunidades del receptor NMDA y promueve la expresión del transportador de glutamato EAAT2.
- III. El tratamiento con DIM modula las alteraciones en la actividad proteolítica de MMP-9 producidas por el EtOH. Esto sugiere que MMP-9 podría participar en el mecanismo de acción por el cual el DIM previene el déficit de memoria.
- IV. El tratamiento con DIM previene la pérdida de neuronas inmaduras inducida por EtOH, pero no interviene en la supervivencia de neuronas maduras, sugiriendo que el mantenimiento de la población de neuronas inmaduras desempeña un papel importante en la protección ejercida por DIM frente a los déficits cognitivos.
- V. Los efectos del tratamiento con DIM sobre los eventos de neurogénesis hipocampal no están mediados por una modificación de la señalización por la ruta de BDNF, ya que los cambios inducidos por este compuesto sobre los componentes de esta vía no parecen fisiológicamente relevantes.
- VI. La prevención del déficit de memoria de reconocimiento no se puede relacionar con la capacidad antioxidante de DIM en nuestro modelo de *binge* de EtOH.



## CONCLUSIONS

The following conclusions are gathered from the ensemble of the presented results:

- I. Treatment with four doses of 3,3'-diindolylmethane (DIM) prevents the impairment of recognition memory induced by binge-like EtOH exposure in a transient manner.
- II. The neuroprotective effect of DIM is associated with the modulation of the homeostasis of the hippocampal glutamatergic neurotransmission system. Treatment with DIM prevents the imbalance in the expression of NMDA receptor subunits and promotes the expression of glutamate transporter EAAT2.
- III. Treatment with DIM modulates the proteolytic activity alterations on MMP-9 produced by EtOH. This suggests that MMP-9 may participate in the mechanism of action by which DIM prevents the memory deficit.
- IV. Treatment with DIM prevents the EtOH-induced loss of immature neurons but does not intervene in the survival of adult-born mature neurons, suggesting that the effects of DIM on cognitive deficits require the maintenance of the immature neuron population.
- V. The effects of DIM treatment on hippocampal neurogenesis processes are not mediated by a modification of the BDNF signalling pathway since the changes induced by DIM in this route do not seem physiologically relevant.
- VI. Recognition memory impairment prevention cannot be related to the antioxidant property DIM in our binge EtOH paradigm.



---

# Referencias

---



## REFERENCIAS

1. World Health Organization. *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*; 2018. Accessed February 4, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>
2. World Health Organization. *Global Strategy to Reduce the Harmful Use of Alcohol*; 2010.
3. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. *Informe 2021. Alcohol, Tabaco y Drogas Ilegales En España*; 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enfcli.2015.09.009><https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>
4. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. *ESDAM 2019/2020. Encuesta Sobre Alcohol, Drogas y Otras Adicciones En Mayores de 64 Años En España*; 2021.
5. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. *Informe 2022. Alcohol, Tabaco y Drogas Ilegales En España*; 2022.
6. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. *Informe 2021. Alcohol, Tabaco y Drogas Ilegales En España. Encuesta Sobre Alcohol y Drogas En España (EDADES) 1995-2019/2020*; 2021. <https://pnsd.sanidad.gob.es/>
7. Regional Office for Europe of the World Health Organization. *Status Report on Alcohol Consumption, Harm and Policy Responses in 30 European Countries*. Vol 2.; 2019.
8. American Psychiatric Association. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-5*; 2013.
9. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Polydrug use: health and social responses. doi:10.2810/756632
10. Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic Diseases and Conditions Related to Alcohol Use. *Alcohol Res*. 2014;35(2):155. Accessed October 19, 2022. </pmc/articles/PMC3908707/>
11. White AM, Tapert S, Shukla SD. Binge Drinking: Predictors, Patterns, and Consequences. *Alcohol Res*. 2018;39(1):1. doi:10.7748/phc.15.6.8.s9
12. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. *NIAAA Newsletter*. [http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter\\_Number3.pdf](http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/Newsletter/winter2004/Newsletter_Number3.pdf). Published 2004.
13. Simon L, Souza-Smith FM, Molina PE. Alcohol-Associated Tissue Injury: Current Views on Pathophysiological Mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2022;84:87-112. doi:10.1146/annurev-physiol-060821-014008
14. Spear LP, Swartzwelder HS. Adolescent alcohol exposure and persistence of adolescent-typical phenotypes into adulthood: a mini-review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;0:1. doi:10.1016/J.NEUBIOREV.2014.04.012
15. Hiller-Sturmhöfel S, Spear LP. Binge Drinking's Effects on the Developing Brain—Animal Models. *Alcohol Res Curr Rev*. 2018;39(1):77. Accessed August 22, 2022. </pmc/articles/PMC6104958/>
16. Sarala M, Miettunen J, Koskela J, et al. Frequent intoxication and alcohol tolerance in adolescence: associations with psychiatric disorders in young adulthood. *Addiction*. 2020;115(5):888-900. doi:10.1111/add.14889
17. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. *Informe 2022. Alcohol, Tabaco y Drogas Ilegales En España. Encuesta Sobre Uso de Drogas En Enseñanzas Secundarias En España (ESTUDES) 1994-2021*; 2022.
18. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2020 National Survey on Drug Use and Health. *HHS Publ No PEP19-5068, NSDUH Ser H-54*. 2021;170:1-62. <https://www.samhsa.gov/data/>
19. Chung T, Creswell KG, Bachrach R, Clark DB, Martin CS. Adolescent Binge Drinking. *Alcohol Res Curr Rev*. 2018;39(1):5-15.
20. Mezey E. Effect of Ethanol on Intestinal Morphology, Metabolism, and Function. *Alcohol Relat Dis Gastroenterol*. Published online 1985:342-360. doi:10.1007/978-3-642-70048-4\_19
21. Pohorecky LA, Brick J. Pharmacology of ethanol. *Pharmacol Ther*. 1988;36:335-427.

## REFERENCIAS

22. Jones AW. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. Published online 2019. doi:10.1002/wfs2.1340
23. Roine RP, Gentry RT, Lim RT, Baraona E, Lieber CS. Effect of Concentration of Ingested Ethanol on Blood Alcohol Levels. *Alcohol Clin Exp Res*. 1991;15(4):734-738. doi:10.1111/j.1530-0277.1991.tb00589.x
24. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012;16(4):667-685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002
25. Matsumoto H, Fukui Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict Biol*. 2002;7:5-14. doi:10.1080/135562101200100553
26. Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. *Drug Metab Rev*. 2019;51(4):545-561. doi:10.1080/03602532.2019.1679169
27. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005;9(1):1-35. doi:10.1016/j.cld.2004.10.005
28. Edenberg HJ. The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Res Heal*. 2007;30(1):5. Accessed October 19, 2022. /pmc/articles/PMC3860432/
29. Krebs HA, Freedland RA, Hems R, Stubbs M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem J*. 1969;112(1):117. doi:10.1042/BJ1120117
30. Wang X, Lemos JR, Dayanithi G, Nordmann JJ, Treistman SN. Ethanol reduces vasopressin release by inhibiting calcium currents in nerve terminals. *Brain Res*. 1991;551(1-2):338-341. doi:10.1016/0006-8993(91)90954-T
31. Gill J. The effects of moderate alcohol consumption on female hormone levels and reproductive function. *Alcohol Alcohol*. 2000;35(5):417-423. doi:10.1093/alcalc/35.5.417
32. Okulate G, Olayinka O, Dogunro AS. Erectile dysfunction: Prevalence and relationship to depression, alcohol abuse and panic disorder. *Gen Hosp Psychiatry*. 2003;25(3):209-213. doi:10.1016/S0163-8343(03)00015-X
33. Valeiro C, Matos C, Scholl J, van Hunsel F. Drug-Induced Sexual Dysfunction: An Analysis of Reports to a National Pharmacovigilance Database. *Drug Saf*. 2022;45(6):639-650. doi:10.1007/s40264-022-01174-3
34. Piano MR. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res Curr Rev*. 2017;38(2):219-241. <https://www.niaaa.nih.gov/>
35. Polednak AP. Recent trends in incidence rates for selected alcohol-related cancers in the United States. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(3):234-238. doi:10.1093/alcalc/agh150
36. Federico A, Cotticelli G, Festi D, et al. The effects of alcohol on gastrointestinal tract, liver and pancreas: Evidence-based suggestions for clinical management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(10):1922-1940.
37. Bishehsari F, Magno E, Swanson G, et al. Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Res*. 2017;38(2):163. Accessed August 31, 2022. /pmc/articles/PMC5513683/
38. Giménez-Gómez P, Pérez-Hernández M, O'Shea E, et al. Changes in brain kynurenine levels via gut microbiota and gut-barrier disruption induced by chronic ethanol exposure in mice. *FASEB J*. 2019;33(11):12900. doi:10.1096/FJ.201900491RR
39. Liu Y, Wu Z, Zhang Y, et al. Alcohol-dependent downregulation of apolipoprotein H exacerbates fatty liver and gut microbiota dysbiosis in mice. *Lipids Health Dis*. 2022;21(1). doi:10.1186/S12944-022-01699-7
40. Schuckit MA. Alcohol-use disorders. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9662):492-501. doi:10.1016/S0140-6736(09)60009-X
41. Trevejo-Nunez G, Kolls JK, de Wit M. Alcohol Use As a Risk Factor in Infections and Healing. *Alcohol Res Curr Rev*. 2015;37(2):177-184.
42. Davies M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci*. 2003;28(4):263-274.
43. Nutt DJ, Tyacke RJ, Spriggs M, Jacoby V, Borthwick AD, Belelli D. Functional Alternatives to Alcohol. *Nutrients*. 2022;14(18). doi:10.3390/nu14183761
44. De La Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol*. 2014;127(1):71-90. doi:10.1007/s00401-013-1233-3
45. McIntosh C, Chick J. Alcohol and the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(3):16-21. doi:10.1136/jnnp.2004.045708

46. Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(1):19-47. doi:10.3109/10408363.2011.580567
47. Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron.* 2017;96(6):1223-1238. doi:10.1016/j.neuron.2017.10.032
48. Zahr NM, Kaufman KL, Harper CG. Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(5):284. doi:10.1038/NRNEUROL.2011.42
49. Poletti S, Radaelli D, Bosia M, et al. Effect of glutamate transporter EAAT2 gene variants and gray matter deficits on working memory in schizophrenia. *Eur Psychiatry.* 2014;29(4):219-225. doi:10.1016/J.EURPSY.2013.07.003
50. Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science (80- ).* 1989;243(4899):1721-1724. doi:10.1126/science.2467382
51. Lovinger DM, Roberto M. Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;13:31-86. doi:10.1007/7854\_2011\_143
52. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(1):73-78. doi:10.1016/j.coph.2004.06.011
53. Möykkynen T, Korpi ER, Lovinger DM. Ethanol inhibits  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor function in central nervous system neurons by stabilizing desensitization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(2):546-555. doi:10.1124/jpet.103.050666
54. Läck AK, Ariwodola OJ, Chappell AM, Weiner JL, McCool BA. Ethanol inhibition of kainate receptor-mediated excitatory neurotransmission in the rat basolateral nucleus of the amygdala. *Neuropharmacology.* 2008;55(5):661-668. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.05.026
55. Meinhardt MW, Hansson AC, Perreau-Lenz S, et al. Neurobiology of Disease Rescue of Infralimbic mGluR 2 Deficit Restores Control Over Drug-Seeking Behavior in Alcohol Dependence. *J Neurosci.* 2013;33(7):2794-2806. doi:10.1523/JNEUROSCI.4062-12.2013
56. Griffin III WC, Haun HL, Hazelbaker CL, Ramachandra VS, Becker HC. Increased Extracellular Glutamate In the Nucleus Accumbens Promotes Excessive Ethanol Drinking in Ethanol Dependent Mice. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39:707-717. doi:10.1038/npp.2013.256
57. Rao PSS, Bell RL, Engleman EA, Sari Y. Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. *Front Neurosci.* 2015;9:144. doi:10.3389/fnins.2015.00144
58. Magee JC, Grienberger C. Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annu Rev Neurosci.* 2020;43:95-117. doi:10.1146/annurev-neuro-090919-022842
59. Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(11):844-858. doi:10.1038/nrn2234
60. Robbins TW, Ersche KD, Everitt BJ. Drug addiction and the memory systems of the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1141:1-21. doi:10.1196/annals.1441.020
61. Gould TJ. Addiction and cognition. *Addict Sci Clin Pract.* 2010;5(2):4-14. Accessed September 17, 2022. /pmc/articles/PMC3120118/
62. Loheswaran G, Barr MS, Rajji TK, Blumberger DM, Le Foll B, Daskalakis ZJ. Alcohol Intoxication by Binge Drinking Impairs Neuroplasticity. *Brain Stimul.* 2016;9(1):27-32. doi:10.1016/j.brs.2015.08.011
63. Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 2015;1621:5-16. doi:10.1016/J.BRAINRES.2015.01.016
64. Connor SA, Wang YT. A Place at the Table: LTD as a Mediator of Memory Genesis. *Neuroscientist.* 2016;22(4):359-371. doi:10.1177/1073858415588498
65. Lasek AW. Effects of Ethanol on Brain Extracellular Matrix: Implications for Alcohol Use Disorder. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(10):2030-2042. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
66. Lasek AW, Hu C, Wei-Yang C. Releasing Addiction Memories Trapped in Perineuronal Nets. *Trends Genet.* 2018;34(3):197-208. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
67. Fawcett JW, Fyhn M, Jendelova P, Kwok JCF, Ruzicka J, Sorg BA. The extracellular matrix and perineuronal nets in memory. *Mol Psychiatry.* Published online 2022. doi:10.1038/s41380-022-01634-3
68. Hu C, Donghong H, Lasek AW. Repeated Binge Drinking Increases Perineuronal Nets in the Insular

## REFERENCIAS

- Cortex. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39(10):1930-1938. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
69. Ethell IM, Ethell DW. Matrix Metalloproteinases in Brain Development and Remodeling: Synaptic Functions and Targets. *J Neurosci Res*. 2007;85:2813-2823. doi:10.1002/jnr
70. Nagy V, Bozdagi O, Matynia A, et al. Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci*. 2006;26(7):1923-1934. doi:10.1523/JNEUROSCI.4359-05.2006
71. Wiera G, Wozniak G, Bajor M, Kaczmarek L, Mozrzykmas JW. Maintenance of long-term potentiation in hippocampal mossy fiber-CA3 pathway requires fine-tuned MMP-9 proteolytic activity. *Hippocampus*. 2013;23(6):529-543. doi:10.1002/hipo.22112
72. Knapska E, Kaczmarek L. Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) in Learning and Memory. In: *Novel Mechanisms of Memory*. Springer International Publishing; 2015:161-181. doi:10.1007/978-3-319-24364-1\_9
73. Contreras-Zentella ML, Villalobos-García D, Hernández-Muñoz R. Ethanol Metabolism in the Liver, the Induction of Oxidant Stress, and the Antioxidant Defense System Ethanol Metabolism in the Liver, the Induction of Oxidant Stress, and the Antioxidant Defense System. *Antioxidants*. 2022;11(7). doi:10.3390/antiox11071258
74. Hernández JA, López-Sánchez RC, Rendón-Ramírez A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(1543809). doi:10.1155/2016/1543809
75. Yeligar SM, Machida K, Kalra VK. Ethanol-induced HO-1 and NQO1 Are Differentially Regulated by HIF-1 $\alpha$  and Nrf2 to Attenuate Inflammatory Cytokine Expression. *J Biol Chem*. 2010;285(46):35359. doi:10.1074/JBC.M110.138636
76. Collins MA, Neafsey EJ. Alcohol, excitotoxicity and adult brain damage: An experimentally unproven chain-of-events. *Front Mol Neurosci*. 2016;9(FEB). doi:10.3389/fnmol.2016.00008
77. Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: A dysfunctional relationship. *Gastroenterology*. 2002;122(7):2049-2063. doi:10.1053/gast.2002.33613
78. Dan Dunn J, Alvarez LAJ, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472. doi:10.1016/J.REDOX.2015.09.005
79. Chan DC. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020;15:235-259. doi:10.1146/annurev-pathmechdis
80. Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion. *Biochem Soc Trans*. 2016;44:1725-1735. doi:10.1042/BST20160129
81. Naghdi S, Slovinsky WS, Madesh M, Rubin E, Hajnóczky G. Mitochondrial fusion and Bid-mediated mitochondrial apoptosis are perturbed by alcohol with distinct dependence on its metabolism. *Cell Death Dis*. 2018;9(10). doi:10.1038/S41419-018-1070-3
82. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:565-598. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009
83. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-238. doi:10.1038/npp.2009.110
84. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):1-18. doi:10.1101/cshperspect.a005751
85. Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:279-306. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130
86. Donato F, Alberini CM, Amso D, Dragoi G, Dranovsky A, Newcombe NS. The ontogeny of hippocampus-dependent memories. In: *Journal of Neuroscience*. Vol 41. Society for Neuroscience; 2021:920-926. doi:10.1523/JNEUROSCI.1651-20.2020
87. Wang C, Furlong TM, Stratton PG, et al. Hippocampus–prefrontal coupling regulates recognition memory for novelty discrimination. *J Neurosci*. 2021;34(3):9617-9632. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-21.2021
88. Chao OY, Nikolaus S, Yang Y-M, Huston JP. Neuronal circuitry for recognition memory of object and place in rodent models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022;141:104855. doi:10.1016/j.neubiorev.2022.104855
89. Crossman AR, Neary D. *Neuroanatomy: An Illustrated Colour Text*. 5th Editio. Elsevier Masson SAS; 2015.

90. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press; 2006.
91. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-R1121. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049
92. Watarai A, Tao K, Wang MY, Okuyama T. Distinct functions of ventral CA1 and dorsal CA2 in social memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2021;68:29-35. doi:10.1016/j.conb.2020.12.008
93. Tamminga CA, Southcott S, Sacco C, Wagner AD, Ghose S. Glutamate dysfunction in hippocampus: relevance of dentate gyrus and CA3 signaling. *Schizophr Bull*. 2012;38(5):927-935. doi:10.1093/SCHBUL/SBS062
94. Clark RE, Squire LR. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(SUPPL2):10365-10370. doi:10.1073/pnas.1301225110
95. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(11):11-21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11
96. Squire LR, Zola-Morgan J. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:259-288. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720
97. Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish AD. Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat Neurosci*. 2017;20(11):1434-1447. doi:10.1038/nn.4661
98. Buzsáki G, Tingley D. Space and time: The hippocampus as a sequence generator. *Trends Cogn Sci*. 2018;22(10):853. doi:10.1016/J.TICS.2018.07.006
99. O'Keefe J, Krupic J. Do hippocampal pyramidal cells respond to nonspatial stimuli? *Physiol Rev*. 2021;101(3):1427-1456. doi:10.1152/physrev.00014.2020
100. Huimin W, Aggleton JP, Brown MW. Different Contributions of the Hippocampus and Perirhinal Cortex to Recognition Memory. *J Neurosci*. 1999;19(3):1142. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-03-01142.1999
101. Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(1):51-61. doi:10.1038/35049064
102. Warren DE, Duff MC, Tranel D, Cohen NJ. Observing degradation of visual representations over short intervals when MTL is damaged. *J Cogn Neurosci*. 2011;23(12):3862. doi:10.1162/JOCN\_A\_00089
103. Koen JD, Borders AA, Petzold MT, Yonelinas AP. Visual short-term memory for high resolution associations is impaired in patients with medial temporal lobe damage. *Hippocampus*. 2017;27(2):184. doi:10.1002/HIPO.22682
104. Voss JL, Bridge DJ, Cohen NJ, Walker JA. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn Sci*. 2017;21(8):577-588. doi:10.1016/j.tics.2017.05.008
105. Bird CM. The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex*. 2017;93(0):155-165. doi:10.1016/j.cortex.2017.05.016
106. García-Pardo MP, De la Rubia Ortí JE, Aguilar Calpe MA. Differential effects of MDMA and cocaine on inhibitory avoidance and object recognition tests in rodents. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;146(October):1-11. doi:10.1016/j.nlm.2017.10.013
107. Drissi I, Deschamps C, Fouquet G, et al. Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A/GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addict Biol*. 2020;25:e12760. doi:10.1111/adb.12760
108. Mittal N, Fleming SM, Martinez A, et al. Sex differences in cognitive performance and alcohol consumption in High Alcohol-Drinking (HAD-1) rats. *Behav Brain Res*. 2020;381. doi:10.1016/J.BBR.2019.112456
109. Mottarlini F, Racagni G, Brambilla P, Fumagalli F, Caffino L. Repeated cocaine exposure during adolescence impairs recognition memory in early adulthood: A role for BDNF signaling in the perirhinal cortex. *Dev Cogn Neurosci*. 2020;43:100789. doi:10.1016/j.dcn.2020.100789
110. White AM. What Happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain. *Alcohol Res Heal*. 2003;27(2):186-196. Accessed September 23, 2022. /pmc/articles/PMC6668891/
111. White AM, Best PJ. Effects of ethanol on hippocampal place-cell and interneuron activity. *Brain Res*. 2000;876(1-2):154-165. doi:10.1016/S0006-8993(00)02629-9
112. Ramachandran B, Ahmed S, Zafar N, Dean C. Ethanol inhibits long-term potentiation in hippocampal

## REFERENCIAS

- CA1 neurons, irrespective of lamina and stimulus strength, through neurosteroidogenesis. *Hippocampus*. 2015;25(1):106-118. doi:10.1002/hipo.22356
113. Gerace E, Landucci E, Bani D, Moroni F, Mannaioni G, Pellegrini-Giampietro DE. Glutamate Receptor-Mediated Neurotoxicity in a Model of Ethanol Dependence and Withdrawal in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Front Neurosci*. 2019;12(1053). doi:10.3389/fnins.2018.01053
  114. Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*. 2002;83:1087-1093. doi:10.1046/J.1471-4159.2002.01214.X
  115. Hebb D. The Organization of Behavior. *New York Wiley*. Published online 1949.
  116. Takeuchi T, Duzkiewicz AJ, Morris RGM. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014;369(20130288). doi:10.1098/RSTB.2013.0288
  117. Morris RGM. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*. 2013;74:32-40. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.014
  118. Cope EC, Gould E. Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*. 2019;24(5):690-705. doi:10.1016/j.stem.2019.03.023
  119. Kim J-H, Marton J, Ametamey SM, Cumming P. A Review of Molecular Imaging of Glutamate Receptors. *Molecules*. 2020;25:4749. doi:10.3390/molecules25204749
  120. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, et al. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev*. 2021;73(4):1469-1658. doi:10.1124/pharmrev.120.000131
  121. Kalivas PW, LaLumiere RT, Knackstedt L, Shen H. Glutamate Transmission in Addiction. *Neuropharmacology*. 2009;56(Suppl 1):169. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2008.07.011
  122. Fazio F, Ulivieri M, Volpi C, Gargaro M, Fallarino F. Targeting metabotropic glutamate receptors for the treatment of neuroinflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;38:16-23. doi:10.1016/J.COPH.2018.01.010
  123. Li SH, Abd-Elrahman KS, Ferguson SSG. Targeting mGluR2/3 for treatment of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *Pharmacol Ther*. 2022;239:108275. doi:10.1016/j.pharmthera.2022.108275
  124. Marmioli P, Cavaletti G. The Glutamatergic Neurotransmission in the Central Nervous System. *Curr Med Chem*. 2012;19(9):1269-1276. doi:10.2174/092986712799462711
  125. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, et al. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*. 2011;226(10):2484-2493. doi:10.1002/jcp.22609
  126. Roberts-Wolfe D, Kalivas P. Glutamate Transporter GLT-1 as a Therapeutic Target for Substance Use Disorders. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2015;14(6):745-756. doi:10.2174/1871527314666150529144655
  127. Reiner A, Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*. 2018;98(6):1080. doi:10.1016/J.NEURON.2018.05.018
  128. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(1):39-47. doi:10.1016/j.coph.2006.08.011
  129. Chandrasekar R. Alcohol and NMDA receptor: Current research and future direction. *Front Mol Neurosci*. 2013;6(14). doi:10.3389/fnmol.2013.00014
  130. Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neurosci*. 2013;19(1):62-75. doi:10.1177/1073858411435129
  131. Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA Receptor Subunit Expression and Its Implications for LTD, LTP, and Metaplasticity. *Neuropharmacology*. 2008;55(7):1081-1094. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.046
  132. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a005710
  133. Alkadhi KA. NMDA receptor-independent LTP in mammalian nervous system. *Prog Neurobiol*. 2021;200(July 2020):101986. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101986
  134. Diering GH, Huganir RL. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*. 2018;100(2):314-329. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.018
  135. Guo C, Ma Y-Y. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front Neural Circuits*. 2021;15(711564). doi:10.3389/fncir.2021.711564

136. Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol.* 2018;150(8):1081-1105. doi:10.1085/jgp.201812032
137. Atwood BK, Lovinger DM, Mathur BN. Presynaptic long-term depression mediated by Gi/o-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2014;37(11):663-673. doi:10.1016/j.tins.2014.07.010
138. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:295-322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
139. Goodwani S, Saternos H, Alasmari F, Sari Y. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;77:14-31. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.02.024
140. Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S. Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. *Front Mol Neurosci.* 2019;12(20). doi:10.3389/fnmol.2019.00020
141. Li SH, Li XJ. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 2004;20(3):146-154. doi:10.1016/j.tig.2004.01.008
142. Joffe ME, Centanni SW, Jaramillo AA, Winder DG, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors in Alcohol Use Disorder: Physiology, Plasticity, and Promising Pharmacotherapies. *ACS Chem Neurosci.* 2018;9(9):2188-2204. doi:10.1021/acscchemneuro.8b00200
143. Crestani AP, Krueger JN, Barragan E V., et al. Metaplasticity contributes to memory formation in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(2):408. doi:10.1038/S41386-018-0096-7
144. Beart PM, O'Shea RD. Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 2007;150:5-17. doi:10.1038/sj.bjp.0706949
145. Fujio M, Nakagawa T, Sekiya Y, et al. Gene transfer of GLT-1, a glutamate transporter, into the nucleus accumbens shell attenuates methamphetamine- and morphine-induced conditioned place preference in rats. *Eur J Neurosci.* 2005;22(11):2744-2754. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04467.x
146. Lauriat TL, McInnes LA. EAAT2 regulation and splicing: Relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol Psychiatry.* 2007;12(12):1065-1078. doi:10.1038/sj.mp.4002065
147. Sharma A, Faraz Kazim S, Larson CS, et al. Divergent roles of astrocytic versus neuronal EAAT2 deficiency on cognition and overlap with aging and Alzheimer's molecular signatures. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(43). doi:10.1073/pnas.1903566116
148. Daniel Limón I, Angulo-Cruz I, Sánchez-Abdon L, Patricio-Martínez A. Disturbance of the Glutamate-Glutamine Cycle, Secondary to Hepatic Damage, Compromises Memory Function. *Front Neurosci.* 2021;15(578922). doi:10.3389/fnins.2021.578922
149. Spangaro M, Bosia M, Bechi M, et al. Neurobiology of cognitive remediation in schizophrenia: Effects of EAAT2 polymorphism. *Schizophr Res.* 2018;202:106-110. doi:10.1016/j.schres.2018.06.059
150. Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(1):42-51. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.003
151. Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36(9):1481-1507. doi:10.1177/0271678X16655551
152. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):1-53. doi:10.3390/ijms21249739
153. Smith ACW, Kupchik YM, Scofield MD, et al. Synaptic plasticity mediating cocaine relapse requires matrix metalloproteinases. *Nat Neurosci.* 2014;17(12):1655. doi:10.1038/NN.3846
154. Yin L, Li F, Li J, et al. Chronic Intermittent Ethanol Exposure Induces Upregulation of Matrix Metalloproteinase-9 in the Rat Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Neurochem Res.* 2019;44(7). doi:10.1007/S11064-019-02783-8
155. Yong VW, Power C, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(7):502-511. doi:10.1038/35081571
156. Bach DR, Näf M, Deutschmann M, Tyagarajan SK, Quednow BB. Threat memory reminder under matrix metalloproteinase 9 inhibitor doxycycline globally reduces subsequent memory plasticity. *J Neurosci.* 2019;39(47):9424-9434. doi:10.1523/JNEUROSCI.1285-19.2019
157. Nagy V, Bozdagi O, Huntley GW. The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. *Learn Mem.* 2007;14(10):655-664.

## REFERENCIAS

- doi:10.1101/lm.678307
158. Dziembowska M, Włodarczyk J. MMP9: A novel function in synaptic plasticity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(5):709-713. doi:10.1016/j.biocel.2012.01.023
  159. Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci.* 2009;29(18):6007-6012. doi:10.1523/JNEUROSCI.5346-08.2009
  160. Verslegers M, Lemmens K, Van Hove I, Moons L. Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2013;105:60-78. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.03.004
  161. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem.* 2016;139:91-114. doi:10.1111/jnc.13415
  162. Kang SS, Kook JH, Hwang S, Park SH, Nam SC, Kim JK. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 attenuated neural progenitor cell migration after photothrombotic ischemia. *Brain Res.* 2008;1228:20-26. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.056
  163. Wójcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, et al. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22465. doi:10.1371/journal.pone.0022465
  164. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem.* 2020;194. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112260
  165. Sorrells SF, Paredes MF, Zhang Z, et al. Positive controls in adults and children support that very few, if any, new neurons are born in the adult human hippocampus. *J Neurosci.* 2021;41(12):2554-2565. doi:10.1523/JNEUROSCI.0676-20.2020
  166. Kuhn HG, Toda T, Gage FH. Adult hippocampal neurogenesis: A coming-of-age story. *J Neurosci.* 2018;38(49):10401-10410. doi:10.1523/JNEUROSCI.2144-18.2018
  167. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(9). doi:10.1101/cshperspect.a018812
  168. Nakafuku M, del Águila Á. Developmental dynamics of neurogenesis and gliogenesis in the postnatal mammalian brain in health and disease: Historical and future perspectives. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2020;9(3):1-20. doi:10.1002/wdev.369
  169. Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1-21. doi:10.3390/ijms21144869
  170. La Rosa C, Parolisi R, Bonfanti L. Brain Structural Plasticity: From Adult Neurogenesis to Immature Neurons. *Front Neurosci.* 2020;14(February):1-9. doi:10.3389/fnins.2020.00075
  171. Von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2007;329(3):409-420. doi:10.1007/s00441-007-0432-4
  172. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016;167(4):897-914. doi:10.1016/j.cell.2016.10.021
  173. Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility-linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(6):335-346. doi:10.1038/nrn.2017.45
  174. Leal G, Bramham CR, Duarte CB. *BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity.* Vol 104. 1st ed. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/bs.vh.2016.10.004
  175. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;220:223-250. doi:10.1007/978-3-642-45106-5\_9
  176. Kanski R, Van Strien ME, Van Tijn P, Hol EM. A star is born: New insights into the mechanism of astrogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(3):433-447. doi:10.1007/s00018-013-1435-9
  177. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia.* 2015;63(8):1320-1329. doi:10.1002/glia.22836
  178. Rusznák Z, Henskens W, Schofield E, Kim WS, Fu YH. Adult Neurogenesis and Gliogenesis: Possible Mechanisms for Neurorestoration. *Exp Neurobiol.* 2016;25(3):103. doi:10.5607/EN.2016.25.3.103
  179. Li T, Zhang S. Microgliosis in the Injured Brain: Infiltrating Cells and Reactive Microglia Both Play a Role. *Neuroscientist.* 2016;22(2):165-170. doi:10.1177/1073858415572079

180. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T, Sierra A. Origin and differentiation of microglia. Published online 2013. doi:10.3389/fncel.2013.00045
181. Chen I, McDougal A, Wang F, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis*. 1998;19:1631-16. doi:10.1093/carcin/19.9.1631
182. Anderton MJ, Manson MM, Verschoyle RD, et al. Pharmacokinetics and tissue disposition of indole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration to mice. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):5233-5241. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0163
183. Thomson CA, Ho E, Strom MB. Chemopreventive properties of 3,3'-diindolylmethane in breast cancer: evidence from experimental and human studies. *Nutr Rev*. 2016;74(7):432-443. doi:10.1093/nutrit/nuw010
184. Thomson CA, Chow HHS, Wertheim BC, et al. A randomized, placebo-controlled trial of diindolylmethane for breast cancer biomarker modulation in patients taking tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165(1):97-107. doi:10.1007/S10549-017-4292-7
185. Yerushalmi R, Bargil S, Ber Y, et al. 3,3'-Diindolylmethane (DIM): a nutritional intervention and its impact on breast density in healthy BRCA carriers. A prospective clinical trial. *Carcinogenesis*. 2020;41(10):1395. doi:10.1093/CARCIN/BGAA050
186. De Miranda BR, Miller JA, Hansen RJ, et al. Neuroprotective efficacy and pharmacokinetic behavior of novel anti-inflammatory para-phenyl substituted diindolylmethanes in a mouse model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;345(1):125-138. doi:10.1124/jpet.112.201558
187. Jeon EJ, Davaatseren M, Hwang JT, et al. Effect of Oral Administration of 3,3'-Diindolylmethane on Dextran Sodium Sulfate-Induced Acute Colitis in Mice. *J Agric Food Chem*. 2016;64(41):7702-7709. doi:10.1021/acs.jafc.6b02604
188. Williams DE. Indoles Derived From Glucobrassicin: Cancer Chemoprevention by Indole-3-Carbinol and 3,3'-Diindolylmethane. *Front Nutr*. 2021;8:734334. doi:10.3389/fnut.2021.734334
189. Bock KW. From TCDD-mediated toxicity to searches of physiologic AHR functions. *Biochem Pharmacol*. 2018;155(June):419-424. doi:10.1016/j.bcp.2018.07.032
190. Abuin-Martínez C, Vidal R, Gutiérrez-López MD, et al. Increased kynurenine concentration attenuates serotonergic neurotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in rats through activation of aryl hydrocarbon receptor. *Neuropharmacology*. 2021;187(January). doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108490
191. Bloom AJ, Upadhyaya P, Kharasch ED. Strain-specific altered nicotine metabolism in 3,3'-diindolylmethane (DIM) exposed mice. *Biopharm Drug Dispos*. 2019;40(5-6):188-194. doi:10.1002/bdd.2182
192. Qian M, Liu J, Zhao D, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency in Intestinal Epithelial Cells Aggravates Alcohol-Related Liver Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;13(1):233. doi:10.1016/J.JCMGH.2021.08.014
193. Dong H, Hao L, Zhang W, et al. Activation of AhR-NQO1 Signaling Pathway Protects Against Alcohol-Induced Liver Injury by Improving Redox Balance. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(3):793. doi:10.1016/J.JCMGH.2021.05.013
194. Wrzosek L, Ciocan D, Hugot C, et al. Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury. *Gut*. 2021;70(7):1299-1308. doi:10.1136/gutjnl-2020-321565
195. Lee BD, Yoo J-M, Yeon Baek S, Li FY, Sok D-E, Kim MR. 3,3'-Diindolylmethane Promotes BDNF and Antioxidant Enzyme Formation via TrkB/Akt Pathway Activation for Neuroprotection against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Hippocampal Neuronal Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3). doi:10.3390/antiox9010003
196. Bridi MS, Hawk JD, Chatterjee S, Safe S, Abel T. Pharmacological Activators of the NR4A Nuclear Receptors Enhance LTP in a CREB/CBP-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42:1243-1253. doi:10.1038/npp.2016.253
197. Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav*. 2005;84:53-63. doi:10.1016/j.physbeh.2004.10.007

## REFERENCIAS

198. Lacaille H, Duterte-Boucher D, Liot D, Vaudry H, Naassila M, Vaudry D. Comparison of the deleterious effects of binge drinking-like alcohol exposure in adolescent and adult mice. *J Neurochem*. 2015;132(6):629-641. doi:10.1111/jnc.13020
199. Ledesma JC, Aguilar MA, Giménez-Gómez P, Miñarro J, Rodríguez-Arias M. Adolescent but not adult ethanol binge drinking modulates cocaine withdrawal symptoms in mice. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172956. doi:10.1371/journal.pone.0172956
200. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275. doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6
201. Paxinos G, Franklin K. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*; 1996. doi:10.1016/s0306-4530(03)00088-x
202. Wolstenholme JT, Mahmood T, Harris GM, Abbas S, Miles MF. Intermittent ethanol during adolescence leads to lasting behavioral changes in adulthood and alters gene expression and histone methylation in the PFC. *Front Mol Neurosci*. 2017;10. doi:10.3389/FNMOL.2017.00307/ABSTRACT
203. Peñasco S, Rico-Barrio I, Puente N, et al. Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*. 2020;45(2):309-318. doi:10.1038/S41386-019-0530-5
204. Liu Y, Zhang Y, Peng J, et al. Autophagy alleviates ethanol-induced memory impairment in association with anti-apoptotic and anti-inflammatory pathways. *Brain Behav Immun*. 2019;82:63-75. doi:10.1016/J.BBI.2019.07.033
205. Lopatynska-Mazurek M, Antolak A, Grochecki P, et al. Rapamycin Improves Spatial Learning Deficits, Vulnerability to Alcohol Addiction and Altered Expression of the GluN2B Subunit of the NMDA Receptor in Adult Rats Exposed to Ethanol during the Neonatal Period. *Biomolecules*. 2021;11(650). doi:10.3390/biom11050650
206. Plaza-Briceño W, Estay SF, De La Fuente-Ortega E, et al. N-Methyl-d-Aspartate Receptor Modulation by Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase Type 2 Drives Synaptic Plasticity and Spatial Memory Impairments in Rats Exposed Pre-and Postnatally to Ethanol. *Antioxidants Redox Signal*. 2020;32(9):602-617. doi:10.1089/ars.2019.7787
207. Tunc-Ozcan E, Wert SL, Lim PH, Ferreira A, Redei EE. Hippocampus-dependent memory and allele-specific gene expression in adult offspring of alcohol-consuming dams after neonatal treatment with thyroxin or metformin. *Mol Psychiatry*. 2018;23:1643-1651. doi:10.1038/mp.2017.129
208. Raghavendra V, Kulkarni SK. Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(6):595-602. doi:10.1016/S0891-5849(00)00447-0
209. Spear LP. Effects of adolescent alcohol consumption on the brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2018;19(4):197-214. doi:10.1038/nrn.2018.10
210. Topiwala A, Ebmeier KP. Effects of drinking on late-life brain and cognition. *Evid Based Ment Health*. 2018;21(1):12-15. doi:10.1136/EB-2017-102820
211. Nguyen-Louie TT, Tracas A, Squeglia LM, Matt GE, Ebersson-Shumate S, Tapert SF. Learning and Memory in Adolescent Moderate, Binge, and Extreme-binge Drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(9):1895-1904. doi:10.1111/acer.13160.Learning
212. Spear LP. Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: Studies using rodent models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;70:228-243. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.07.026
213. Vetreno RP, Yaxley R, Paniagua B, Crews FT, Author AB. Diffusion Tensor Imaging Reveals Adolescent Binge Ethanol-induced Brain Structural Integrity Alterations in Adult Rats that Correlate with Behavioral Dysfunction HHS Public Access Author manuscript. *Addict Biol*. 2016;21(4):939-953. doi:10.1111/adb.12232
214. Hauser SR, Mulholland PJ, Truitt WA, et al. Adolescent intermittent ethanol (Aie) enhances the dopaminergic response to ethanol within the mesolimbic pathway during adulthood: Alterations in cholinergic/dopaminergic genes expression in the nucleus accumbens shell. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21). doi:10.3390/IJMS222111733
215. Swartzwelder HS, Park MH, Acheson S. Adolescent Ethanol Exposure Enhances NMDA Receptor-

- Mediated Currents in Hippocampal Neurons: Reversal by Gabapentin. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-7. doi:10.1038/s41598-017-12956-6
216. Vetreno RP, Crews FT. Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning. *Front Neurosci.* 2015;9(FEB):35. doi:10.3389/fnins.2015.00035
217. Squeglia LM, Tapert SF, Sullivan E V, et al. Brain Development in Heavy-Drinking Adolescents. *Am J Psychiatry.* 2015;172:531-542. doi:10.1176/appi.ajp.2015
218. De Goede J, Van Der Mark-Reeuwijk KG, Braun KP, et al. Alcohol and Brain Development in Adolescents and Young Adults: A Systematic Review of the Literature and Advisory Report of the Health Council of the Netherlands. *Adv Nutr.* 2021;12(4):1379-1410. doi:10.1093/advances/nmaa170
219. Desroches D, Orevillo C, Verina D. Sex- and strain-related differences in first-pass alcohol metabolism in mice. *Alcohol.* 1995;12(3):221-226. doi:10.1016/0741-8329(94)00098-X
220. Kishimoto R, Ogishi Y, Ueda M, et al. *Gender-Related Differences in Mouse Hepatic Ethanol Metabolism.* Vol 48.; 2002.
221. Sneddon EA, White RD, Radke AK. Sex Differences in Binge-Like and Aversion-Resistant Alcohol Drinking in C57BL/6J Mice. Published online 2018. doi:10.1111/acer.13923
222. Flores-Bonilla A, Richardson HN. Sex Differences in the Neurobiology of Alcohol Use Disorder. *Alcohol Res Curr Rev.* 2020;40(2):04. doi:10.35946/arcr.v40.2.04
223. Squeglia LM, Schweinsburg AD, Pulido C, Tapert SF. Adolescent Binge Drinking Linked to Abnormal Spatial Working Memory Brain Activation: Differential Gender Effects. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(10). doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01527.x
224. Fama R, Le Berre A-P, Sullivan E V. Alcohol's Unique Effects on Cognition in Women: A 2020 (Re)view to Envision Future Research and Treatment. *Alcohol Res Curr Rev.* 2020;40(2). doi:10.35946/arcr.v40.2.03
225. Rabiant K, Antol J, Naassila M, Pierrefiche O. Sex difference in the vulnerability to hippocampus plasticity impairment after binge-like ethanol exposure in adolescent rat: Is estrogen the key? *Addict Biol.* 2021;26:e13002. doi:10.1111/adb.13002
226. Abbott KN, Morris MJ, Westbrook RF, Reichelt AC. Sex-specific effects of daily exposure to sucrose on spatial memory performance in male and female rats, and implications for estrous cycle stage. *Physiol Behav.* 2016;162:52-60. doi:10.1016/j.physbeh.2016.01.036
227. do Nascimento EB, Dierschnabel AL, de Macêdo Medeiros A, Suchecki D, Silva RH, Ribeiro AM. Memory impairment induced by different types of prolonged stress is dependent on the phase of the estrous cycle in female rats. *Horm Behav.* 2019;115. doi:10.1016/J.YHBEH.2019.104563
228. Hokenson RE, Short AK, Chen Y, et al. Unexpected Role of Physiological Estrogen in Acute Stress-Induced Memory Deficits. *J Neurosci.* 2021;41(4):648-662. doi:10.1523/JNEUROSCI.2146-20.2020
229. Sutcliffe JS, Marshall KM, Neill JC. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res.* 2007;177(1):117-125. doi:10.1016/j.bbr.2006.10.029
230. Sutcliffe JS. Female Rats Are Smarter than Males: Influence of Test, Oestrogen Receptor Subtypes and Glutamate. *Curr Top Behav Neurosci.* 2011;8:37-56. doi:10.1007/7854
231. Möykkynen T, Korpi ER. Acute Effects of Ethanol on Glutamate Receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Published online 2012:n/a-n/a. doi:10.1111/j.1742-7843.2012.00879.x
232. Allgaier C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochem Int.* 2002;41(6):377-382. doi:10.1016/S0197-0186(02)00046-3
233. den Hartog CR, Gilstrap M, Eaton B, et al. Effects of Repeated Ethanol Exposures on NMDA Receptor Expression and Locomotor Sensitization in Mice Expressing Ethanol Resistant NMDA Receptors. *Front Neurosci.* 2017;11:84. doi:10.3389/fnins.2017.00084
234. Jin Z, Bhandage AK, Bazov I, et al. Selective increases of AMPA, NMDA, and kainate receptor subunit mRNAs in the hippocampus and orbitofrontal cortex but not in prefrontal cortex of human alcoholics. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(11):1-10. doi:10.3389/fncel.2014.00011
235. Imbriglio T, Verhaeghe R, Antenucci N, et al. Developmental up-regulation of NMDA receptors in the prefrontal cortex and hippocampus of mGlu5 receptor knock-out mice. *Mol Brain.* 2021;14(77). doi:10.1186/S13041-021-00784-9

## REFERENCIAS

236. Rzemieniec J, Bratek E, Wnuk A, Przepiórska K, Salińska E, Kajta M. Neuroprotective effect of 3,3'-Diindolylmethane against perinatal asphyxia involves inhibition of the AhR and NMDA signaling and hypermethylation of specific genes. *Apoptosis*. 2020;25(9-10):747-762. doi:10.1007/s10495-020-01631-3
237. Holehonnur R, Phensy AJ, Kim LJ, et al. Increasing the GluN2A/GluN2B ratio in neurons of the mouse basal and lateral amygdala inhibits the modification of an existing fear memory trace. *J Neurosci*. 2016;36(36):9490-9504. doi:10.1523/JNEUROSCI.1743-16.2016
238. Ge M, Song H, Li H, et al. Memory Susceptibility to Retroactive Interference Is Developmentally Regulated by NMDA Receptors. *Cell Rep*. 2019;26(8):2052-2063.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.098
239. Li QQ, Chen J, Hu P, et al. Enhancing GluN2A-type NMDA receptors impairs long-term synaptic plasticity and learning and memory. *Mol Psychiatry*. Published online 2022. doi:10.1038/S41380-022-01579-7
240. De Ferron BS, Bennouar KE, Kervern M, et al. Two binges of ethanol a day keep the memory away in adolescent rats: Key role for GLUN2B subunit. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(1):1-11. doi:10.1093/ijnp/pyv087
241. Morrisett RA, Swartzwelder HS. Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: A patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J Neurosci*. 1993;13(5):2264-2272. doi:10.1523/jneurosci.13-05-02264.1993
242. Guan YZ, Ye JH. Ethanol blocks long-term potentiation of GABAergic synapses in the ventral tegmental area involving mu-opioid receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(9):1841-1849. doi:10.1038/NPP.2010.51
243. Helfer JL, White ER, Christie BR. Enhanced deficits in long-term potentiation in the adult dentate gyrus with 2nd trimester ethanol consumption. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0051344
244. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):383-400. doi:10.1038/nrn3504
245. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 2002;5(5):405-414. doi:10.1038/nn835
246. Lujan B, Liu X, Qi W. Differential roles of glun2A- and GluN2B-containing NMDA receptors in neuronal survival and death. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(4):211-218. Accessed September 26, 2022. /pmc/articles/PMC3544217/
247. Liu Y, Tak PW, Aarts M, et al. NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *J Neurosci*. 2007;27(11):2846. doi:10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007
248. Terasaki Y, Sasaki T, Yagita Y, et al. Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1441-1449. doi:10.1038/jcbfm.2010.18
249. Carlezon WA, Nestler EJ. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: A trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci*. 2002;25(12):610-615. doi:10.1016/S0166-2236(02)02289-0
250. Beckley JT, Laguesse S, Phamluong K, Morisot N, Wegner SA, Ron D. The First Alcohol Drink Triggers mTORC1-Dependent Synaptic Plasticity in Nucleus Accumbens Dopamine D1 Receptor Neurons. *J Neurosci*. 2016;36(3):701-713. doi:10.1523/JNEUROSCI.2254-15.2016
251. Nimitvilai S, Uys JD, Woodward JJ, et al. Orbitofrontal Neuroadaptations and Cross-Species Synaptic Biomarkers in Heavy-Drinking Macaques. *Neurobiol Dis*. 2017;37(13):3646-3660. doi:10.1523/JNEUROSCI.0133-17.2017
252. Gerace E, Ilari A, Caffino L, et al. Ethanol neurotoxicity is mediated by changes in expression, surface localization and functional properties of glutamate AMPA receptors. *J Neurochem*. 2021;157(6):2106-2118. doi:10.1111/jnc.15223
253. Yao H, Shen H, Yu H, et al. Chronic ethanol exposure induced depressive-like behavior in male C57BL/6 N mice by downregulating GluA1. *Physiol Behav*. 2021;234(113387). doi:10.1016/j.physbeh.2021.113387
254. Frye GD, Fincher A. Sustained ethanol inhibition of native AMPA receptors on medial septum/diagonal band (MS/DB) neurons. *Br J Pharmacol*. 2000;129:87-94.
255. Faccidomo S, Cogan ES, Hon OJ, et al. Calcium-permeable AMPA receptor activity and GluA1 trafficking in the basolateral amygdala regulate operant alcohol self-administration. *Addict Biol*. 2021;26(5):1-14.

- doi:10.1111/adb.13049
256. Woodward Hopf F, Mangieri RA. Do Alcohol-Related AMPA-Type Glutamate Receptor Adaptations Promote Intake? In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 248. Springer New York LLC; 2018:157-186. doi:10.1007/164\_2018\_105
  257. Shen G, Van Sickle BJ, Tietz EI. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Mediates Hippocampal Glutamatergic Plasticity During Benzodiazepine Withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:1897-1909. doi:10.1038/npp.2010.61
  258. Ponzoni L, Moretti M, Braida D, et al. Increased sensitivity to  $\Delta^9$ -THC-induced rewarding effects after seven-week exposure to electronic and tobacco cigarettes in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2019;29(4):566-576. doi:10.1016/j.euroneuro.2019.02.001
  259. Peng X-X, Cabeza De Vaca S, Ziff EB, Carr KD. Involvement of nucleus accumbens AMPA receptor trafficking in augmentation of D-amphetamine reward in food-restricted rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231:3055-3063. doi:10.1007/s00213-014-3476-7
  260. Cantacorps L, Montagud-Romero S, Luján MA, Valverde O. Prenatal and postnatal alcohol exposure increases vulnerability to cocaine addiction in adult mice. *Br J Pharmacol*. 2020;177:1090-1105. doi:10.1111/bph.14901
  261. Luessen DJ, Conn PJ. Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors as Novel Therapeutics for Neuropsychiatric Disease. *Pharmacol Rev*. 2022;74(630-661):630-661. doi:10.1124/pharmrev.121.000540
  262. Meinhardt MW, Pfarr S, Fouquet G, et al. Psilocybin targets a common molecular mechanism for cognitive impairment and increased craving in alcoholism. *Sci Adv*. 2021;7(eabh2399):1-13. <https://www.science.org>
  263. Ding ZM, Ingraham CM, Rodd ZA, McBride WJ. Alcohol drinking increases the dopamine-stimulating effects of ethanol and reduces D2 auto-receptor and group II metabotropic glutamate receptor function within the posterior ventral tegmental area of alcohol preferring (P) rats. *Neuropharmacology*. 2016;109:41-48. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.05.023
  264. Cippitelli A, Damadzic R, Frankola K, et al. Alcohol-Induced Neurodegeneration, Suppression of Transforming Growth Factor- $\beta$ , and Cognitive Impairment in Rats: Prevention by Group II Metabotropic Glutamate Receptor Activation. *Biol Psychiatry*. 2010;67(9):823-830. doi:10.1016/j.biopsych.2009.12.018
  265. Alasmari F, Goodwani S, McCullumsmith RE, Sari Y. Role of glutamatergic system and mesocorticolimbic circuits in alcohol dependence. *Prog Neurobiol*. 2018;171:32-49. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.10.001
  266. Lovinger DM. Presynaptic Ethanol Actions: Potential Roles in Ethanol Seeking. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 248. Springer New York LLC; 2018:29-54. doi:10.1007/164\_2017\_76
  267. Gonçalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chem Biol Interact*. 2010;186:53-60. doi:10.1016/j.cbi.2010.04.011
  268. Marie A, Meunier J, Brun E, et al. N-acetylcysteine treatment reduces age-related hearing loss and memory impairment in the senescence-accelerated prone 8 (SAMP8) mouse model. *Aging Dis*. 2018;9(4):664-673. doi:10.14336/AD.2017.0930
  269. More J, Galusso N, Veloso P, et al. N-Acetylcysteine Prevents the Spatial Memory Deficits and the Redox-Dependent RyR2 Decrease Displayed by an Alzheimer's Disease Rat Model. *Front Aging Neurosci*. 2018;10. doi:10.3389/fnagi.2018.00399
  270. Smaga I, Frankowska M, Filip M. N-acetylcysteine in substance use disorder: a lesson from preclinical and clinical research. *Pharmacol Reports*. 2021;73(5):1205-1219. doi:10.1007/s43440-021-00283-7
  271. Israel Y, Quintanilla ME, Ezquer F, et al. Aspirin and N-acetylcysteine co-administration markedly inhibit chronic ethanol intake and block relapse binge drinking: Role of neuroinflammation-oxidative stress self-perpetuation. *Addict Biol*. 2021;26(1). doi:10.1111/adb.12853
  272. Burnette EM, Nieto SJ, Grodin EN, et al. Novel Agents for the Pharmacological Treatment of Alcohol Use Disorder. *Drugs*. 2022;82:251-274. doi:10.1007/s40265-021-01670-3
  273. Pereira AC, Gray JD, Kogan JF, et al. Age and Alzheimer's disease gene expression profiles reversed by the glutamate modulator riluzole. *Mol Psychiatry*. 2017;22(2):296-305. doi:10.1038/mp.2016.33
  274. Yang Y, Ji W gang, Zhang Y jie, et al. Riluzole ameliorates soluble A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced impairments in spatial

## REFERENCIAS

- memory by modulating the glutamatergic/GABAergic balance in the dentate gyrus. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2021;108(August):110077. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.110077
275. Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, et al. Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. *Brain Res*. 2003;963:252-261. www.elsevier.com/locate/brainres
276. Rubio-Araiz A, Porcu F, Pérez-Hernández M, et al. Disruption of blood-brain barrier integrity in postmortem alcoholic brain: preclinical evidence of TLR4 involvement from a binge-like drinking model. *Addict Biol*. 2017;22(4):1103-1116. doi:10.1111/adb.12376
277. Bach DR, Näf M, Deutschmann M, Tyagarajan SK, Quednow BB. Threat Memory Reminder Under Matrix Metalloproteinase 9 Inhibitor Doxycycline Globally Reduces Subsequent Memory Plasticity. *J Neurosci*. 2019;39(47):9424-9434. doi:10.1523/JNEUROSCI.1285-19.2019
278. Montagne A, Nation DA, Sagare AP, et al. APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature*. 2020;581(7806):71-76. doi:10.1038/s41586-020-2247-3
279. Ciccone L, Vandooren J, Nencetti S, Orlandini E. Natural Marine and Terrestrial Compounds as Modulators of Matrix Metalloproteinases-2 (MMP-2) and MMP-9 in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(2):1-25. doi:10.3390/PH14020086
280. Mi X, Cao Y, Li Y, et al. The Non-peptide Angiotensin-(1-7) Mimic AVE 0991 Attenuates Delayed Neurocognitive Recovery After Laparotomy by Reducing Neuroinflammation and Restoring Blood-Brain Barrier Integrity in Aged Rats. *Front Aging Neurosci*. 2021;13(624387). doi:10.3389/fnagi.2021.624387
281. Du H, Zhang X, Zeng Y, et al. A Novel Phytochemical, DIM, Inhibits Proliferation, Migration, Invasion and TNF- $\alpha$  Induced Inflammatory Cytokine Production of Synovial Fibroblasts From Rheumatoid Arthritis Patients by Targeting MAPK and AKT/mTOR Signal Pathway. *Front Immunol*. 2019;10(1620). doi:10.3389/FIMMU.2019.01620
282. Rajoria S, Suriano R, George A, et al. Estrogen induced metastatic modulators MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in thyroid cancer. *PLoS One*. 2011;6(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0015879
283. Kim BG, Kim JW, Kim SM, Go RE, Hwang KA, Choi KC. 3,3'-Diindolylmethane Suppressed Cyprodinil-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastatic-Related Behaviors of Human Endometrial Ishikawa Cells via an Estrogen Receptor-Dependent Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(189). doi:10.3390/IJMS19010189
284. Tian L, Stefanidakis M, Ning L, et al. Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage. *J Cell Biol*. 2007;178(4):687-700. doi:10.1083/jcb.200612097
285. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 2002;39:279-291. doi:10.1002/GLIA.10108
286. Pradeepkumar Singh L, Kundu P, Ganguly K, Mishra A, Swarnakar S. Novel role of famotidine in downregulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(2):289-299. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.027
287. Moosavi M, SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F. Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal MMP2, MMP-9 and MAPKs alteration. *Eur J Pharmacol*. 2018;819:248-253. doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.007
288. Klintsova AY, Helfer JL, Calizo LH, Dong WK, Goodlett CR, Greenough WT. Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(12):2073-2082. doi:10.1111/j.1530-0277.2007.00528.x
289. Taffe MA, Kotzebue RW, Crean RD, Crawford EF, Edwards S, Mandyam CD. Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(24):11104-11109. doi:10.1073/PNAS.0912810107
290. Liu W, Crews FT. Persistent Decreases in Adult Subventricular and Hippocampal Neurogenesis Following Adolescent Intermittent Ethanol Exposure. *Front Behav Neurosci*. 2017;11(151). doi:10.3389/FNBEH.2017.00151
291. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):260-265. doi:10.1038/6365

292. Madsen TM, Kristjansen PEG, Bolwig TG, Wörtwein G. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*. 2003;119(3):635-642. doi:10.1016/S0306-4522(03)00199-4
293. Tong XK, Royea J, Hamel E. Simvastatin rescues memory and granule cell maturation through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2022;13(4). doi:10.1038/S41419-022-04784-Y
294. Choi MR, Han JS, Jin YB, et al. Differential expression of microRNAs in the hippocampi of male and female rodents after chronic alcohol administration. *Biol Sex Differ*. 2020;11(1). doi:10.1186/s13293-020-00342-3
295. Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K. Alcohol inhibition of neurogenesis: A mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*. 2010;20(5):596. doi:10.1002/HIPO.20665
296. Le Maître TW, Dhanabalan G, Bogdanovic N, Alkass K, Druid H. Effects of Alcohol Abuse on Proliferating Cells, Stem/Progenitor Cells, and Immature Neurons in the Adult Human Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43:690-699. doi:10.1038/NPP.2017.251
297. Wei GZ, Martin KA, Xing PY, et al. Tryptophan-metabolizing gut microbes regulate adult neurogenesis via the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(27). doi:10.1073/PNAS.2021091118
298. Vukovic J, Borlikova GG, Ruitenber MJ, et al. Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci*. 2013;33(15):6603-6613. doi:10.1523/JNEUROSCI.3064-12.2013
299. Ieraci A, Herrera DG. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS Med*. 2006;3(4):547-557. doi:10.1371/JOURNAL.PMED.0030101
300. Ji Z, Yuan L, Lu X, Ding H, Luo J, Ke Z-J. Binge Alcohol Exposure Causes Neurobehavioral Deficits and GSK3 $\beta$  Activation in the Hippocampus of Adolescent Rats. *Sci REPORTs* |. 2018;8:3088. doi:10.1038/s41598-018-21341-w
301. Dhanabalan G, Le Maître TW, Bogdanovic N, Alkass K, Druid H. Hippocampal granule cell loss in human chronic alcohol abusers. *Neurobiol Dis*. 2018;120:63-75. doi:10.1016/j.nbd.2018.08.011
302. Mendez-David I, David DJ, Deloménie C, Beaulieu J-M, Gardier AM, Hen R. A Non-Linear Relation between Levels of Adult Hippocampal Neurogenesis and Expression of the Immature Neuron Marker Doublecortin. *SSRN Electron J*. Published online 2020. doi:10.2139/ssrn.3616375
303. Dhaliwal J, Xi Y, Bruel-Jungerman E, Germain J, Francis F, Lagace DC. Doublecortin (DCX) is not Essential for Survival and Differentiation of Newborn Neurons in the Adult Mouse Dentate Gyrus. *Front Neurosci*. 2015;9(JAN):494. doi:10.3389/FNINS.2015.00494
304. Nixon K, Kim DH, Potts EN, He J, Crews FT. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis. *Neurobiol Dis*. 2008;31(2):218-229. doi:10.1016/J.NBD.2008.04.009
305. McClain JA, Morris SA, Deeny MA, et al. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. *Brain Behav Immun*. 2011;25(SUPPL. 1). doi:10.1016/j.bbi.2011.01.006
306. Al-Onaizi M, Al-Khalifah A, Qasem D, Elali A. Role of Microglia in Modulating Adult Neurogenesis in Health and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6875):1-27. doi:10.3390/IJMS21186875
307. Silva-Peña D, García-Marchena N, Alén F, et al. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. *Addict Biol*. 2019;24(5):1019-1033. doi:10.1111/adb.12668
308. Stragier E, Massart R, Salery M, et al. Ethanol-induced epigenetic regulations at the Bdnf gene in C57BL/6J mice. *Mol Psychiatry*. 2015;20(3):405-412. doi:10.1038/mp.2014.38
309. Briones TL, Woods J. Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. *Neuroscience*. 2013;254:324-334. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.031
310. McGough NNH, He DY, Logrip ML, et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: A homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci*. 2004;24(46):10542-10552. doi:10.1523/JNEUROSCI.3714-04.2004

## REFERENCIAS

311. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Dingeon P, Arancibia S, Beaugé F. Effects of alcohol on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in discrete regions of the rat hippocampus and hypothalamus. *J Neurosci Res*. 2001;63(2):200-208.
312. Martín-González C, Romero-Acevedo L, Fernández-Rodríguez CM, et al. Brain-derived neurotrophic factor among patients with alcoholism. *CNS Spectr*. 2021;26(4):400-405. doi:10.1017/S1092852920001431
313. Girard M, Labrunie A, Malauzat D, Nubukpo P. Evolution of BDNF serum levels during the first six months after alcohol withdrawal. *World J Biol Psychiatry*. 2020;21(10):739-747. doi:10.1080/15622975.2020.1733079
314. Liran M, Rahamim N, Ron D, Barak S. Growth Factors and Alcohol Use Disorder. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(12):a039271. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A039271
315. Yoo MH, Kim T-Y, Yoon YH, Koh J-Y. Autism phenotypes in ZnT3 null mice: Involvement of zinc dyshomeostasis, MMP-9 activation and BDNF upregulation. *Nat Publ Gr*. Published online 2016. doi:10.1038/srep28548
316. Fragkouli A, Tsilibary EC, Tzinia AK. Neuroprotective role of MMP-9 overexpression in the brain of Alzheimer's 5xFAD mice. *Neurobiol Dis*. 2014;70:179-189. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.021
317. Niculescu D, Michaelsen-Preusse K, Güner Ü, van Dorland R, Wierenga CJ, Lohmann C. A BDNF-Mediated Push-Pull Plasticity Mechanism for Synaptic Clustering. *Cell Rep*. 2018;24:2063-2074. doi:10.1016/J.CELREP.2018.07.073
318. Boulle F, Kenis G, Cazorla M, et al. TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. *Prog Neurobiol*. 2012;98(2):197-206. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.06.002
319. Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(12):850-860. doi:10.1038/nrn2738
320. Leggio GM, Camillieri G, Platania CBM, et al. Dopamine D3 receptor is necessary for ethanol consumption: An approach with buspirone. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(8):2017-2028. doi:10.1038/npp.2014.51
321. Hensler JG, Ladenheim EE, Lyons WE. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT 1A ) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice. *J Neurochem*. 2003;85:1139-1147. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01748.x
322. Li XX, Yang T, Wang N, et al. 7,8-Dihydroxyflavone Attenuates Alcohol-Related Behavior in Rat Models of Alcohol Consumption via TrkB in the Ventral Tegmental Area. *Front Neurosci*. 2020;14. doi:10.3389/fnins.2020.00467
323. Pandey SN, Kwatra M, Dwivedi DK, Choubey P, Lahkar M, Jangra A. 7,8-Dihydroxyflavone alleviated the high-fat diet and alcohol-induced memory impairment: behavioral, biochemical and molecular evidence. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020;237(6):1827-1840. doi:10.1007/s00213-020-05502-2
324. García-Díaz Barriga G, Giralt A, Anglada-Huguet M, et al. 7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLCc1 pathway. *Hum Mol Genet*. 2017;26(16):3144-3160. doi:10.1093/hmg/ddx198
325. Pascual M, Climent E, Guerri C. BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport*. 2001;12(12):2673-2677. doi:10.1097/00001756-200108280-00017
326. Drake CT, Milner TA, Patterson SL. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*. 1999;19(18):8009-8026. doi:10.1523/jneurosci.19-18-08009.1999
327. Pereira DB, Rebola N, Rodrigues RJ, Cunha RA, Carvalho AP, Duarte CB. TrkB Receptors Modulation of Glutamate Release Is Limited to a Subset of Nerve Terminals in the Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci Res*. 2006;83:832-844. doi:10.1002/jnr
328. Marini AM, Rabin SJ, Lipsky RH, Mocchetti I. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem*. 1998;273(45):29394-29399. doi:10.1074/jbc.273.45.29394
329. Crozier RA, Bi C, Han YR, Plummer MR. BDNF modulation of NMDA receptors is activity dependent. *J Neurophysiol*. 2008;100(6):3264-3274. doi:10.1152/jn.90418.2008
330. Martire A, Pepponi R, Domenici MR, Ferrante A, Chiodi V, Popoli P. BDNF prevents NMDA-induced

- toxicity in models of Huntington's disease: The effects are genotype specific and adenosine A2A receptor is involved. *J Neurochem.* 2013;125(2):225-235. doi:10.1111/jnc.12177
331. Neasta J, Ben Hamida S, Yowell Q V., Carnicella S, Ron D. AKT Signaling Pathway in the Nucleus Accumbens Mediates Excessive Alcohol Drinking Behaviors. *Biol Psychiatry.* 2011;70(6):575. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2011.03.019
  332. Cozzoli DK, Kaufman MN, Nipper MA, Hashimoto JG, Wiren KM, Finn DA. Functional Regulation of PI3K-Associated Signaling in the Accumbens by Binge Alcohol Drinking in Male but not Female Mice. *Neuropharmacology.* 2016;105:164. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2016.01.010
  333. Savarese AM, Lasek AW. Transcriptional Regulators as Targets for Alcohol Pharmacotherapies. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol 248. Springer New York LLC; 2018:505-533. doi:10.1007/164\_2018\_101
  334. Zhang H, Kyzar EJ, Bohnsack JP, Kokare DM, Teppen T, Pandey SC. Adolescent alcohol exposure epigenetically regulates CREB signaling in the adult amygdala. *Sci Rep.* 2018;8(1):10376. doi:10.1038/s41598-018-28415-9
  335. Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, et al. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol Dis.* 2016;90:3-19. doi:10.1016/j.nbd.2015.10.011
  336. Meininger GA, Luisa Del Moral M, Kumar Mohankumar S, et al. Astragaloside IV Derivative (LS-102) Alleviated Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by Inhibiting Drp1 Ser616 Phosphorylation-Mediated Mitochondrial Fission. *Front Pharmacol.* 2020;11(1083). doi:10.3389/fphar.2020.01083
  337. Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Fares FA. Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3 0-diindolylmethane through the mitochondrial pathway. *Br J Cancer.* 2004;91:1358-1363. doi:10.1038/sj.bjc.6602145
  338. Gong Y, Sohn H, Xue L, Firestone GL, Bjeldanes LF. 3,3'-Diindolylmethane Is a Novel Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP Synthase Inhibitor that Can Induce p21Cip1/Waf1 Expression by Induction of Oxidative Stress in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2006;66(9):4880-4887. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4162
  339. Liu D, Li J, Rong X, Li J, Peng Y, Shen Q. Cdk5 Promotes Mitochondrial Fission via Drp1 Phosphorylation at S616 in Chronic Ethanol Exposure-Induced Cognitive Impairment. *Mol Neurobiol.* 2022;59(12):7075-7094.
  340. Kandimalla R, Reddy PH. Multiple Faces of Dynamin-related Protein 1 and Its Role in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):814-828. doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.018.
  341. Salman M, Akram M, Shahrukh M, Ishrat T, Parvez S. Effects of pramipexole on beta-amyloid1-42 memory deficits and evaluation of oxidative stress and mitochondrial function markers in the hippocampus of Wistar rat. *Neurotoxicology.* 2022;92:91-101. doi:10.1016/j.neuro.2022.07.006
  342. Baek SH, Park SJ, Jeong JI, et al. Inhibition of Drp1 ameliorates synaptic depression, A $\beta$  deposition, and cognitive impairment in an alzheimer's disease model. *J Neurosci.* 2017;37(20):5099-5110. doi:10.1523/JNEUROSCI.2385-16.2017
  343. Schipper HM, Song W, Tavitian A, Cressatti M. The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease. *Prog Neurobiol.* 2019;172:40-70. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.06.008
  344. Zhong Y, Dong G, Luo H, et al. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology.* 2012;302(2-3):275-284. doi:10.1016/j.tox.2012.08.009
  345. Ros-Simó C, Moscoso-Castro M, Ruiz-Medina J, Ros J, Valverde O. Memory impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice. *J Neurochem.* 2013;125:736-746. doi:10.1111/jnc.12247
  346. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(7):411-425. doi:10.1038/s41577-020-00491-x
  347. Leclercq S, De Timary P, Delzenne NM, Stärkel P. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl Psychiatry.* 2017;7. doi:10.1038/tp.2017.15
  348. Cantacorps L, Alfonso-Loeches S, Moscoso-Castro M, et al. Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioural dysfunctions in offspring

## REFERENCIAS

- mice. *Neuropharmacology*. 2017;123:368-384. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.05.034
349. Antón M, Rodríguez-González A, Ballesta A, et al. Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide. *Br J Pharmacol*. 2018;175(24):4464. doi:10.1111/BPH.14501